

Aus dem Institut für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Sensomotorische Phänotypisierung von Mausmodellen für zentralnervöse
Bewegungsstörungen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Julia Gerstenberger
aus Borna

Leipzig, 2017

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Walter Brehm

Betreuer: Professor Dr. Angelika Richter

Gutachter: Professor Dr. Angelika Richter
Institut für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie
Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig

Professor Dr. Heidrun Potschka
Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie
Ludwig-Maximilians-Universität München

Tag der Verteidigung: 02.05.2017

Meinen Eltern

Abkürzungsverzeichnis

Publikationsverzeichnis

| | | |
|---------|---|----|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 2 | Literaturübersicht | 3 |
| 2.1 | Mausmodelle für Bewegungsstörungen..... | 3 |
| 2.1.1 | Bedeutung von Mausmodellen für zentralnervöse Bewegungsstörungen | 3 |
| 2.1.2 | Sensomotorische Phänotypisierung von Mausmodellen..... | 4 |
| 2.2 | Die Thy1-aSyn Maus als Modell für die Parkinson-Erkrankung | 7 |
| 2.2.1 | Definition, Bedeutung und Verlauf der Parkinson-Erkrankung | 7 |
| 2.2.2 | Ätiologie und Pathophysiologie..... | 8 |
| 2.2.3 | Therapie der Parkinson-Erkrankung | 11 |
| 2.2.4 | Tiermodelle der Parkinson-Erkrankung..... | 12 |
| 2.2.4.1 | Übersicht und Einteilung etablierter Tiermodelle | 12 |
| 2.2.4.2 | Das Thy1-aSyn Mausmodell | 12 |
| 2.3 | Die DYT1 Knock-in (KI) Maus als Modell für eine generalisierte Dystonieform.... | 16 |
| 2.3.1 | Definition, Einteilung und Genetik von Dystonien | 16 |
| 2.3.2 | Pathophysiologie der Dystonien | 18 |
| 2.3.3 | Therapie von Dystonien | 18 |
| 2.3.4 | Tiermodelle für primäre Dystonien..... | 19 |
| 2.3.4.1 | Übersicht und Einteilung etablierter Tiermodelle | 19 |
| 2.3.4.2 | Das DYT1 Knock-in (KI) Mausmodell | 20 |
| 2.4 | Fragestellungen der vorliegenden Arbeit..... | 25 |
| 3 | Publikation 1 | 27 |
| 4 | Publikation 2 | 37 |
| 5 | Diskussion | 44 |
| 5.1 | Aspekte zur Methodik..... | 45 |
| 5.2 | Ergebnisse | 50 |
| 6 | Zusammenfassung..... | 57 |
| 7 | Summary | 59 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|---|----------------------------|----|
| 8 | Literaturverzeichnis | 61 |
| | Danksagung..... | 81 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------|---|
| Abb. | Abbildung |
| ARB-Test | adaptiver rotierender Balkentest, adaptive rotating beam test |
| BG | Basalganglien |
| bzgl. | bezüglich |
| bzw. | beziehungsweise |
| D1 bis D5 | Subtypen 1 und 5 von Dopaminrezeptoren |
| GABA | γ -Aminobuttersäure |
| GP | Globus pallidus |
| GPe | Globus pallidus externus |
| GPI | Globus pallidus internus |
| IPS | Idiopathisches Parkinson-Syndrom |
| KI | Knock-in |
| KO | Knock-out |
| L-DOPA | Levodopa, L-3,4-Dihydroxyphenylalanin |
| LTD | Langzeit-Depression |
| LTP | Langzeit-Potenzierung |
| MAO | Monoaminoxidase |
| N. | Nucleus |
| o. g. | oben genannte |
| PD | Parkinson-Krankheit, Parkinson's disease |
| qPCR | quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion |
| SN | Substantia nigra |
| SNc | Substantia nigra pars compacta |
| SNr | Substantia nigra pars reticularis |
| STR | Striatum |
| s. o. | siehe oben |
| s. u. | siehe unten |
| TH | Tyroxin-Hydroxylase |
| u. a. | unter anderem |
| v. a. | vor allem |
| z. B. | zum Beispiel |
| ZNS | Zentralnervensystem |
| z. T. | zum Teil |

Publikationsverzeichnis

Originalarbeiten

- **Gerstenberger J**, Bauer A, Helmschrodt C, Richter A, Richter F. The novel adaptive rotating beam test unmasks sensorimotor impairments in a transgenic mouse model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res.* 2016;304:102-10.
- Richter F, **Gerstenberger J**, Bauer A, Liang CC, Richter A. Sensorimotor tests unmask a phenotype in the DYT1 knock-in mouse model of dystonia. *Behav Brain Res.* 2016;317:536-41.
- Sprote C, Richter F, Bauer A, **Gerstenberger J**, Richter A. The alpha2beta3gamma2 GABAA receptor preferring agonist NS11394 aggravates dystonia in the phenotypic dtosz model. *Eur J Pharmacol.* 2016;791:655-8.

Vorträge

- **Gerstenberger J**, Richter F, Richter A. Development of a sensitive motor behavioral test for phenotyping of mouse models of movement disorders. 25. VETPHARM-Symposium; 2015 Oct 01-02; Hannover.
- **Gerstenberger J**, Bauer A, Richter F, Richter A. Phenotyping of a knock-in mouse model of primary torsion dystonia and investigation of the influence of cholinergic interneurons on motor deficits. Interdisziplinäres Kolloquium des Zentrums für Veterinärmedizinische Grundlagenwissenschaften; 2016 Jul 08; Leipzig.
- Bauer, A, **Gerstenberger, J**, Richter, F, Richter, A. Optogenetic studies on dysfunctions of striatal cholinergic interneurons in DYT1 knock-in mice, 26. VETPHARM-Symposium, 2016 Oct 06-07; München.

Poster

- **Gerstenberger J**, Richter F, Richter A. Verhaltenstests zur Analyse von Kognition und Motorik an Mausmodellen für Dystonie und Parkinson. 3. Leipziger Doktorandenforum; 2014 Oct 11; Leipzig. ISBN: 978-3-00-047277-0.
- **Gerstenberger J**, Bauer A, Richter F, Richter A. Phenotyping of a knock-in mouse model of primary torsion dystonia and pharmacological behavioral effects of quinpirole. 82nd Annual Meeting of the German Society for Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology (DGPT). Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol (2016) 389 (Suppl 1):S1-S104; 317.
- Richter F, **Gerstenberger J**, Bauer A, Helmschrodt C, Richter A. Robust sensorimotor deficits in a knock-in mouse model of primary torsion dystonia. 20st International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders. *Mov Disord.* (2016) 31 (Suppl 2), 1674.

1 Einleitung

Für die Aufklärung pathophysiologischer Zusammenhänge zentralnervöser Erkrankungen und für die Erforschung und Entwicklung geeigneter Therapieoptionen spielen Tiermodelle eine herausragende Rolle (CHESSELET und RICHTER 2011, RICHTER und RICHTER 2014). Um Aussagen über deren Eignung für wissenschaftliche Fragestellungen treffen zu können, bedarf es einer intensiven Charakterisierung dieser Modelle. Hierfür wurden verschiedene Verhaltenstests, u.a. zur Analyse der Motorik, Sensorik und Kognition etabliert. Sensitiven Testapparaturen kommt dabei eine hohe Bedeutung zu, insbesondere im Hinblick auf Tiermodelle, die lediglich moderate Verhaltensauffälligkeiten zeigen.

Die transgene Thy1-aSyn Maus stellt ein etabliertes Modell für die Parkinson-Krankheit (PD, „Parkinson's disease“) dar. Sie ist als die zweit häufigste neurodegenerative Bewegungsstörung durch progressiven Bewegungsverlust, Degeneration dopaminerger Neurone und dem Vorkommen von α -Synuclein enthaltenden Einschlusskörperchen (Lewy-Körperchen) gekennzeichnet (HIRSCH et al. 2013). Neben den schwerwiegenden motorischen Beeinträchtigungen in der klinisch manifesten Phase der Erkrankung wurden allerdings auch Abweichungen der sensomotorischen Integration bei den Patienten beschrieben (ABBRUZZESE und BERARDELLI 2003). Transgene Thy1-aSyn Mäuse, die durch die Überexpression von humanem Wildtyp- α -Synuclein charakterisiert sind, spiegeln zahlreiche pathomorphologische Charakteristika der PD wieder und sind zur Erforschung neuroprotektiver Substanzen geeignet (CHESSELET et al. 2012). Allerdings zeigen lediglich die männlichen Tiere in bisherigen Verhaltensuntersuchungen einen robusten Phänotyp mit motorischen Defiziten. Für die fehlenden Symptome der Weibchen wurde bislang die Tatsache verantwortlich gemacht, dass sich das Transgen auf dem X-Chromosom befindet. Aber auch kompensatorische Mechanismen könnten für eine Verschleierung der Verhaltensdefizite in Frage kommen. In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst die Transgenexpression von humanem α -Synuclein in der Substantia nigra (SN) mithilfe quantitativer Echtzeit-PCR in beiden Geschlechtern analysiert werden. Um einen den weiblichen Mutanten zugrunde liegenden Endophänotyp aufzudecken, sollte als wichtiges Ziel dieser Arbeit ein neuer sensomotorischer Verhaltenstest entwickelt werden.

Für die Forschung und Therapieentwicklung von Dystonien haben gut charakterisierte Tiermodelle eine gleichermaßen hohe Bedeutung. Genetische Mausmodelle der primären DYT1-Torsionsdystonie zeichnen sich durch eine sehr hohe „construct validity“ aus, da sie dem Erkrankungsbild des Menschen hinsichtlich der auslösenden Faktoren sehr nahe stehen (RICHTER und RICHTER 2014). Dieser Form der Dystonien, welche durch unwillkürliche Muskelkontraktionen, schraubenartige Bewegungsmuster und abnorme Körperhaltungen gekennzeichnet sind, liegt eine Deletion von drei Basenpaaren im DYT1-Gen zugrunde, das für das ubiquitäre Protein TorsinA kodiert (OZELIUS et al. 1997). Nur etwa 30 % aller humanen Mutationsträger der DYT1-Dystonie entwickeln dystone Symptome. Trotz zahlreicher Gemeinsamkeiten zwischen dem DYT1 KI Mausmodell und Humanpatienten zeigen die Tiere in bisherigen Verhaltensanalysen keine oder nur dezente motorische Beeinträchtigungen und repräsentieren daher möglicherweise die nicht-dystonen Träger der genetischen Veränderung, bei denen allerdings Störungen der sensomotorischen Integration

nachgewiesen wurden (ABBRUZZESE und BERARDELLI 2003, RICHTER und RICHTER 2014). Die Erforschung der Einflüsse auf die Penetranz der Erkrankung und die Aufdeckung eines Endophänotyps der DYT1 KI Mäuse können für das Verständnis pathophysiologischer Mechanismen von ausschlaggebender Bedeutung sein. Um diese Fragestellung und die damit in Verbindung stehende Funktion der Sensomotorik im Mausmodell näher zu untersuchen, wurden spezifische Verhaltensstudien an diesen Mäusen durchgeführt.

2 Literaturübersicht

2.1 Mausmodelle für Bewegungsstörungen

2.1.1 Bedeutung von Mausmodellen für zentralnervöse Bewegungsstörungen

Tiermodelle finden sowohl in der Grundlagenforschung, als auch bei der Erforschung pathophysiologischer Prozesse und in der Arzneimittelforschung Anwendung. Für neurowissenschaftliche Fragestellungen wird ihnen eine besondere Bedeutung zuteil, da diese Modelle aufgrund der Komplexität der neuronalen Netzwerke bislang noch nicht adäquat durch in-vitro-Verfahren zu ersetzen sind. Hier werden sie vor allem als Simulation für spezielle Symptome oder Krankheiten verwendet (GRÜNDER und BENKERT 2012). Mäuse finden dabei den mit Abstand größten Einsatz, da sie zum einen dem Menschen unter Abwägung der phylogenetischen Vergleichbarkeit einerseits und der ethischen Vertretbarkeit andererseits am nächsten stehen. Zum anderen können genetisch modifizierte Modelle generiert werden, da das Mausgenom entschlüsselt wurde. Um Phänomene aus einer bestimmten Spezies in ein geeignetes Modell zu übertragen, werden verschiedene Methoden, wie z. B. experimentelle, pharmakologische oder genetische Manipulationen angewandt (VAN DER STAAY et al. 2009). Die Qualität eines zuverlässigen Modells wird bestimmt durch seine **Verlässlichkeit** („*reliability*“) und seine **Aussagekraft** („*validity*“). Erstere beschreibt dabei die Beständigkeit und Stabilität des Modells, die mit einer objektiven Messbarkeit, einer geringen Variabilität innerhalb eines und zwischen den Versuchsobjekten sowie einer hohen Reproduzierbarkeit einhergehen sollten (TRYON 1957, MARKOU et al. 1993). Bezüglich der Validität eines Tiermodells unterscheidet man zwischen folgenden drei Säulen (Abb. 1): die „*construct validity*“ beschreibt ähnlich auslösende Ursachen (Gendefekt, Pathophysiologie) zur Erkrankung beim Patienten. Die „*face validity*“ spiegelt möglichst alle Symptome und pathomorphologischen Merkmale im Modell wider und die „*predictive validity*“, als dritte Säule, steht für die vergleichbare Wirkung potentieller Therapeutika im Tiermodell (WILLNER 1984). Die Ergebnisse molekularbiologischer, biochemischer, genetischer, elektrophysiologischer oder verhaltensanalytischer Untersuchungsmethoden an den Mäusen lassen Rückschlüsse auf diese Kriterien und damit auf ihre Eignung als Modell zu. Der beachtliche Vorteil von nicht-invasiven Verhaltenstests besteht darin, dass der komplexe, funktionelle Zusammenhang involvierter Signalwege des Gehirns integrativ in den Ergebnissen zum Tragen kommt (GRÜNDER und BENKERT 2012). Zentralnervöse Bewegungsstörungen, wie die PD (hypokinetisch), Dystonien oder Chorea Huntington (hyperkinetisch) zeichnen sich durch Dysfunktionen des motorischen Systems aus, die sich in Symptomen wie Akinesie, Tremor, Rigor, Dyskinesie, Ataxie oder Myoklonie äußern (FAHN et al. 2011). Um die (Sensio-) Motorik im Mausmodell zu untersuchen und damit den Phänotyp als Kennzeichen der „*face validity*“ genauer zu charakterisieren, wurden eine Reihe von Verhaltenstests etabliert, die in Abhängigkeit von der Fragestellung in der Lage sind,

Fehlfunktionen aufzudecken und zu analysieren. Die Generierung eines robusten Phänotyps ist dabei essentiell für die Eignung des Modells zur Entwicklung neuer Therapieoptionen. Sensitive Testmethoden leisten im Hinblick auf das „**3-R-Prinzip**“ („*refinement*“, „*reduction*“, „*replacement*“) einen Beitrag dazu, Tierversuche zu verfeinern und so die Anzahl der Versuchstiere zu reduzieren (GUHAD 2005).

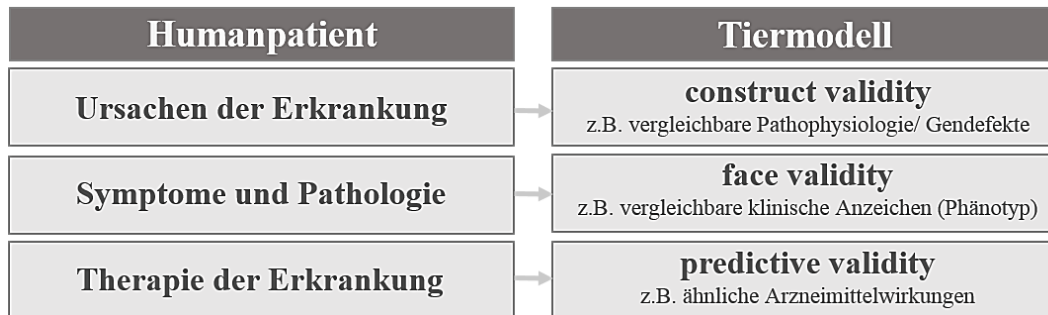


Abb. 1: Beurteilung der Validität von Tiermodellen. Die drei Säulen der „construct validity“, „face validity“ und „predictive validity“ im Modellorganismus spiegeln die Ursachen, Symptome bzw. die Therapie der Erkrankung des humanen Patienten wider. Modifiziert nach CHESSELET und RICHTER (2011).

2.1.2 Sensomotorische Phänotypisierung von Mausmodellen

Im Folgenden werden Beispiele für etablierte Methoden zur Evaluierung motorischer und sensomotorischer Funktionen vorgestellt. Trotz der schwerpunktorientierten Strukturierung ist dabei zu beachten, dass die Verhaltenstests nie eine einzelne motorische Qualität untersuchen können, sondern vielmehr kombinatorische, u. a. auch sensorische und kognitive Einflüsse auf das Verhalten widerspiegeln.

Untersuchungen zum Aktivitätsverhalten: Der am weitesten verbreitete und standardisierte Verhaltenstest zur Untersuchung der lokomotorischen Aktivität und des natürlichen Erkundungsverhaltens ist der **Offenfeld-Test** („**open field test**“) (HENDERSON 1967). Zahlreiche motorische Parameter können im Offenfeld untersucht werden. Dazu zählen die horizontale sowie die vertikale Aktivität, die zurückgelegte Wegstrecke innerhalb des Untersuchungszeitraumes oder die Zeit, in der die Tiere sich vornehmlich im Zentrum bzw. am Rand und in den Ecken („**Thigmotaxis**“) der Versuchsbox aufhalten (BOGUSZEWSKI und ZAGRODZKA 2002). Für die Analyse dieser Kriterien haben sich automatisierte Photozell-Apparaturen oder aber spezielle Software-Systeme, die Videoaufnahmen verarbeiten und eine objektive und effektive Auswertung ermöglichen, durchgesetzt (STANFORD 2007, YORK et al. 2013). Eine weitere Möglichkeit zur Analyse des Explorationsverhaltens bietet das **Lochbrett** („**hole board test**“), das aus Holz oder Plexiglas besteht und mit kleinen Löchern ausgestattet ist. Die automatisierte Quantifizierung kann hier z. B. durch Infrarot-Lichtstrahlen erfolgen, die beim Eintauchen des Mausekopfes in die Löcher durchbrochen und damit detektiert werden (TAKEDA et al. 1998). Auch das Laufrad („**wheel running test**“) kann das motorische Aktivitätsverhalten von Mäusen analysieren,

wobei die Umdrehungszahl des Rades innerhalb eines bestimmten Zeitintervalls oder aber die zirkadiane Nutzungsfrequenz des Geräts bestimmt werden kann (VALENTINUZZI et al. 1997, SWALLOW et al. 1998).

Haltungs- und Ganganalysen: Geringgradige Abweichungen der Schrittmuster, Ganganomalien sowie Ataxien können durch die Analyse der **Fußabdrücke** („**footprint pattern**“) von Mäusen präzise quantifiziert werden. Nachdem die Füße der Tiere in Tinte oder Farbe getunkt werden, durchlaufen sie einen Tunnel. Die auf dem weißen Papier der Bodenoberfläche hinterlassenen Abdrücke können hinsichtlich multipler Parameter ausgewertet werden, wie die Schrittlänge oder der Seitenabstand von Vorder- und Hintergliedmaßen (CRAWLEY 2007). Mithilfe verschiedener Softwares können diese Schrittanalysen detailgenau ausgewertet werden, die z. B. während der Fortbewegung auf einem Laufband aufgenommen werden (WOOLEY et al. 2005). Im **Katalepsie-Test** wird überprüft, ob die Tiere eine Bewegungsstarre aufweisen (SANBERG et al. 1988). Dazu werden sie in eine passive Körperhaltung gebracht und anschließend die Zeit gemessen, die sie für die Korrektur der vorgegebenen Position benötigen. Außerdem kann die Evaluierung verschiedener neurologischer **Reflexe** Beeinträchtigungen der Motorik aufdecken, dazu zählen u. a. der Stellungsreflex, der Haltungsreflex, der Greifreflex oder die Untersuchung der negativen Geotaxis (FOX 1965, LUBICS et al. 2005). Die Körperhaltung und die korrekte Reflexreaktion werden dabei meist manuell mithilfe eines numerischen Bewertungsmaßstabes bestimmt.

Verhaltenstests zur Beurteilung von motorischer Koordination und Balance: Das **Rotarod** zur Analyse motorischer Koordination und Balance wurde ursprünglich von DUNHAM und MIYA (1957) zur Untersuchung von Substanzeffekten auf das Zentralnervensystem (ZNS) entwickelt. Die Tiere werden hierbei auf eine mit gleichbleibender Geschwindigkeit rotierende Walze gesetzt und anschließend die Zeit bis zum Hinunterfallen notiert. Im Laufe der Zeit wurden die Protokolle um verschiedene Parameter, wie z. B. die Beschleunigung der Drehgeschwindigkeit oder ein mehrtägiges Training erweitert (JONES und ROBERTS 1968, BUITRAGO et al. 2004). Zur Analyse der Feinmotorik wurde der **Balkentest** („**balance-beam test**“) entwickelt, der anfänglich aus horizontalen, ca. 50 cm erhöhten, viereckigen und runden Holzbalken bzw. -stäben verschiedener Durchmesser bestand, die die Mäuse in einem mehrtägigen Training zu überqueren hatten, um von einem hell erleuchteten Ausgangspunkt in eine dunkle, geschützte Box zu gelangen. Ausgewertet wurden anschließend die Zeit, die sie zum Überqueren der Stäbe benötigten und die Fehler, die als ein Wegrutschen auf dem Stab definiert wurden (CARTER et al. 1999). Bis heute existieren zahlreiche Abwandlungen, um den Test zu verfeinern und den Schwierigkeitsgrad für die Tiere zu erhöhen. Es wurde z. B. ein Gittergeflecht auf den sich verjüngenden Plexiglasbalken aufgebracht, der in den Heimkäfig der Tiere führt. Eine anschließende Videoanalyse ermöglicht dabei die Auswertung spezifischer Parameter (GOLDBERG et al. 2003, FLEMING et al. 2004). Ähnliche

Testvarianten stellen der „**grid walking test**“ oder der **Fußfehler-Test** („**foot-fault test**“) dar, bestehend aus einem Gittersteg, auf dem die Maus eine bestimmte Wegstrecke zurückzulegen hat bzw. über einen definierten Zeitraum das neue Gelände frei untersuchen kann und auch hier im Anschluss die Fehlritte auf der Plattform in Relation zur Aktivität gezählt werden (HERNANDEZ und SCHALLERT 1988, Z'GRAGGEN et al. 1998, CHAO et al. 2012). In einem umgedrehten Gitter („**inverted grid test**“) kann neben der Muskelkraft die motorische Koordination und Kletteraktivität anhand verschiedener Parameter in ähnlicher Weise analysiert werden (FLEMING et al. 2004). Auch der „**pole test**“ kann Beeinträchtigungen der Motorik und Koordinationsfähigkeit aufdecken und wurde einst zur Beurteilung der Bradykinesie in Mausmodellen der PD entwickelt und später modifiziert (OGAWA et al. 1985, MATSUURA et al. 1997, SEDELIS et al. 2001). In diesem Versuch werden die Tiere kopfaufwärts auf einen vertikalen Holzstab gesetzt und die Zeit dokumentiert, die die Mäuse benötigen, um sich umzudrehen und hinunterzuklettern. Der **Treppen-Test** („**staircase test**“) kann die Geschicklichkeit und Händigkeit der Tiere untersuchen. Die Apparatur besteht aus einer Box mit vier bis sieben Treppenstufen mit kleinen Vertiefungen, in denen sich Futterpellets befinden. Innerhalb eines definierten Zeitintervalls kann in diesem Versuch u. a. die Anzahl der von den zuvor futterrestriktierten Tieren aufgehobenen und gefressenen Futterbrocken ausgewertet werden (MONTROYA et al. 1991, LOSCHER et al. 1996). Des Weiteren kann der natürliche Instinkt zum Nestbau genutzt werden, um die dafür nötigen komplexen orofazialen und feinmotorischen Fähigkeiten der Vordergliedmaßen zu messen (FLEMING et al. 2004). In diesem **Nestbau-Test**, der auf Untersuchungen von UPCHURCH und SCHALLERT (1983) zurückgeht, wird der Gebrauch von Nistmaterial, das außerhalb des Käfigs (z. B. in der Futterraufe) platziert wird, durch regelmäßiges Wiegen quantifiziert (SEDELIS et al. 2000). Darüber hinaus kann im **Morris-Wasserlabyrinth** u. a. die Fähigkeit des Schwimmens untersucht werden (BROOKS et al. 2004).

Verhaltenstests zur Beurteilung der Muskelkraft: Um die Griffstärke der Vorder- und Hintergliedmaßen zu ermitteln und so Rückschlüsse auf neuromuskuläre Beeinträchtigungen zu gewinnen, kann der „**wire-hang test**“ genutzt werden (CRAWLEY 2007). Hierbei werden die Mäuse auf einen Gitterkäfigdeckel gesetzt, der langsam um 180 Grad gedreht wird. Protokolliert wird anschließend die Zeit bis zum Hinunterfallen der Tiere bei nachlassender Muskelkraft (SANGO et al. 1996). Eine weitere Methode, um die Griffstärke der Vordergliedmaßen der Mäuse mithilfe eines Kraftmessgerätes zu bestimmen, stellt der **Griffstärkentest** („**grip strength test**“) dar.

Weitere Verhaltenstests zur Analyse der Sensomotorik: In der Regel messen sensomotorische Verhaltenstests die motorische Antwort, die nach Manipulation des sensorischen Systems erfolgt. Störungen dieser sensomotorischen Verschaltungen können z. B. bei der Untersuchung der **Schreckreaktion** („**acoustic/ tactile startle response**“) analysiert werden. Hierfür wird die Erschütterung der Tiere nach der Präsentation akustischer oder taktiler Reize in Form von Tönen oder Luftströmen mithilfe geeigneter

Messvorrichtungen und –instrumenten, wie piezoelektrischen Sensoren, detektiert. Unter Einbeziehung von schwächeren Stimuli unmittelbar vor dem eigentlichen, dominanten Signal kann die Messung der **Präpulsinhibition** erfolgen, die ein Maß für die sensomotorische Integrationsleistung des Gehirns darstellt. Ist die physiologische Verminderung der Schreckantwort durch den Präpuls reduziert, würde dies auf eine gestörte Informationsverarbeitung der Tiere hindeuten (PAYLOR und CRAWLEY 1997, CURZON et al. 2009). Der sog. „**adhesive removal test**“ wurde ursprünglich zur Quantifizierung von Bewegungsasymmetrien bei Ratten mit unilateralen nigrostriatalen Läsionen entwickelt und ermöglicht die Beurteilung sensomotorischer Beeinträchtigungen (SCHALLERT et al. 1982, BOUET et al. 2009). In diesem Versuch wird untersucht, welche Zeit das Tier benötigt, um einen Aufkleber, der auf den Vorder-, Hintergliedmaßen, der Schwanzbasis oder aber dem Nasenrücken platziert wurde, zu bemerken und zu berühren (sensorische Komponente) und im zweiten Schritt mit den Pfoten zu entfernen (motorische Antwort). **Sensomotorische Reflextests** wie der Vibrissen-Test („whisker-test“), der Lidschlagreflextest, der Ohrzuck-Reflextest oder ein Test zur Überprüfung der Gliedmaßenplatzierung („limb placing test“) können ebenfalls zur Überprüfung sensorischer und motorischer Verschaltungsfunktionen dienen. In Verhaltenstests, die prioritär zur Untersuchung des sensorischen Systems entwickelt wurden, können durch die Messung der motorischen Antwort allerdings ebenso Wechselwirkungen der Sensorik und Motorik aufgedeckt werden, wenngleich sie dafür eine untergeordnete Rolle spielen. Zur Analyse der **Nozizeption** wird beispielsweise im Schwanzbewegungs- („tail flick test“) oder Heizplattentest („hot plate test“) die Schmerzreaktion auf Hitze gemessen (COLE et al. 2001). Zur Untersuchung des **Geruchssinnes** wird standardmäßig der „buried food test“ angewandt, bei dem der motorische Faktor in dem Herausgraben von versteckten Futterpellets besteht (YANG und CRAWLEY 2009).

2.2 Die Thy1-aSyn Maus als Modell für die Parkinson-Erkrankung

2.2.1 Definition, Bedeutung und Verlauf der Parkinson-Erkrankung

Als zweit häufigste neurodegenerative Erkrankung nach der Alzheimer-Krankheit spielt die bereits im Jahre 1817 erstmals als Schüttellähmung bezeichnete Parkinson-Krankheit (PD, „Parkinson’s disease“) mit einer Prävalenz von 1,8 % bei den über 65-Jährigen eine bedeutende Rolle (DE RIJK et al. 2000, GOTZ 2006, LEBOUVIER et al. 2009). Sie ist charakterisiert durch die vier klinischen Kardinalsymptome Bradykinese, Tremor, Rigor und posturale Instabilität (JANKOVIC 2008). Typischerweise beginnen die motorischen Dysfunktionen einseitig und prägen sich im weiteren Krankheitsverlauf asymmetrisch aus (DJALDETTI et al. 2006). Darüber hinaus treten zahlreiche weitere, auch nicht-motorische Symptome in unterschiedlicher Ausprägung in Erscheinung, oftmals bereits vor dem Auftreten der Kardinalsymptome. Dazu zählen vegetative Störungen, wie Obstipation, Drangkontinenz, Seborrhoe, Störungen der Thermoregulation und sensorische Defizite (z. B.

Dysästhesien, Anosmie), Schlafstörungen, kognitive Beeinträchtigungen und Depressionen (LEVIN und KATZEN 2005, JANKOVIC 2008, POSTUMA et al. 2012). Hinsichtlich ihrer zugrunde liegenden Ursachen können Parkinson-Syndrome in drei Kategorien eingeteilt werden (GERLACH et al. 2007). Terminologisch unterscheidet man dabei zwischen der primären und der sekundären PD sowie den atypischen Parkinson-Plus-Syndromen. Zur ersten Form zählen zum einen die idiopathischen Parkinson-Syndrome (IPS), deren Ursachen ungeklärt sind und die mit etwa 90 % den mit Abstand größten Anteil ausmachen (HUNOT und HIRSCH 2003). Zum anderen fallen die familiären Parkinson-Syndrome unter diese Kategorie, bei denen genetisch vererbte Faktoren als Ursache für die Erkrankung identifiziert worden sind, die allerdings nur eine Minderheit aller Fälle darstellen (JAIN et al. 2005). Der sekundären Form der PD liegen z. B. toxische, medikamentöse oder traumatische Krankheitsauslöser zu Grunde. Weiterhin spricht man vom Parkinson-Plus- oder atypischen Parkinson-Syndrom, wenn das Vorkommen einer Parkinson-Symptomatik im Zuge anderer neurodegenerativer Erkrankungen, wie beispielsweise einer kortikobasalganglionären Degeneration oder Multisystematrophien auftritt (NACIMIENTO 2006). In den Jahren vor Eintreten erster Anzeichen spricht man von der prodromalen Phase der Krankheit, die vor allem durch nicht-motorische Symptome gekennzeichnet ist (POSTUMA et al. 2012). Erst nach einer 70 bis 80 %igen Degeneration dopaminergener Neurone, die als wichtigstes pathophysiologisches Kennzeichen der PD angesehen wird, werden die typischen motorischen Symptome der Patienten manifest (SCHAPIRA 1999).

2.2.2 Ätiologie und Pathophysiologie

Obwohl die **Ätiologie** des IPS bislang nicht aufgeklärt werden konnte, wird ursächlich eine Kombination polygenetischer, umweltbedingter sowie Altersfaktoren vermutet (Abb. 2). Diese setzten verschiedene zellspezifische und zellübergreifende Pathomechanismen in Gang, die vermutlich synergistisch zum Zelltod und damit zur dopaminergen Neurodegeneration führen. Zu diesen pathogenetischen Prozessen, die wahrscheinlich interagierend und multifaktoriell zur Entwicklung der Erkrankung beitragen, zählen u. a. oxidativer Stress, Mitochondriendysfunktion, Proteinaggregation, Störungen im Ubiquitin-Proteasomen-Signalweg, Autophagie, Dysregulation der Calcium-Homöostase, Inflamationsprozesse und Exzitotoxizität (BETARBET et al. 2002, DI MONTE 2003, HIRSCH et al. 2013, JELLINGER 2015, KLINGELHOEFER und REICHMANN 2015). Die Abbildung 2 stellt den hypothetischen Zusammenhang zwischen Ätiologie und Pathogenese des IPS zusammenfassend dar. Bei der **hereditären** PD, die durch Mutationen spezifischer Gene charakterisiert ist, wurden bereits zahlreiche Genloci (PARK1 bis 16) als Auslöser identifiziert. Eine bedeutende Rolle spielt hierbei das Protein α -Synuclein, das den Genloci PARK1 und PARK4 zugeordnet wird und eine Hauptkomponente der Lewy-Körperchen darstellt. Als Bestandteil von Membranen und vesikulären Strukturen wird es im gesamten ZNS exprimiert (AULUCK et al. 2010). Seine Funktionen sind bis heute noch nicht endgültig geklärt, allerdings scheint es in die Dopaminspeicherung und -ausschüttung sowie in die

Regulation und das Recycling synaptischer Vesikel involviert zu sein. (PEREZ et al. 2002, YU et al. 2005, VILLAR-PIQUE et al. 2015). Als Folge von Mutationen und anderen molekularen Einflüssen kann es seine ungefaltete Struktur über Vorstufen (Protofibrillen) hin zu aggregierenden, sich ablagernden Fibrillen ändern und dadurch wahrscheinlich toxisch wirken (SCHULZ 2005).

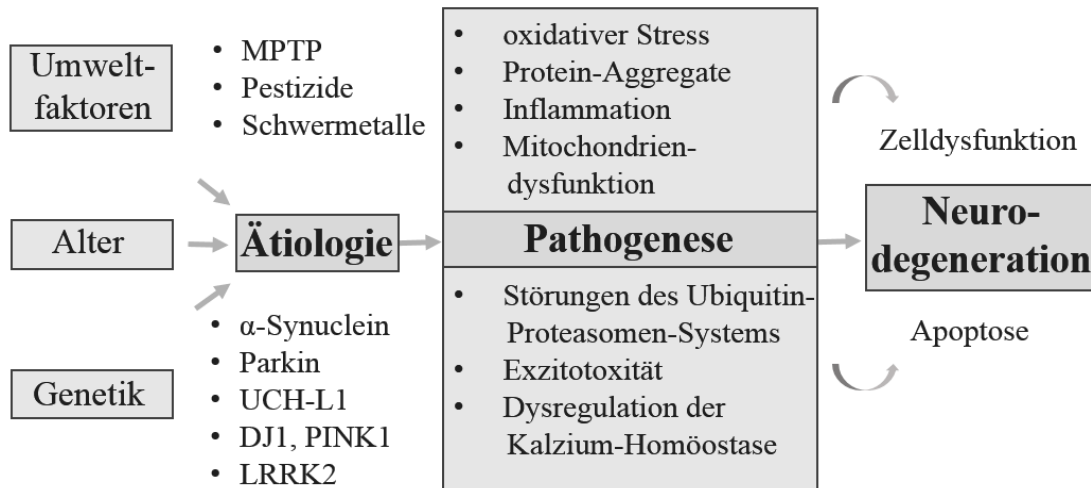


Abb. 2: Hypothese zur multifaktoriellen Ätiologie und Pathogenese des IPS. Modifiziert nach SCHAPIRA et al. (2005).

Als **pathomorphologisches Hauptcharakteristikum** liegt der PD ein Verlust dopaminerger Neurone, insbesondere in der Substantia nigra pars compacta (SNc), zugrunde (BLANDINI et al. 2000). Dieser Transmitterverlust hat weitreichende Auswirkungen auf die Schaltkreise innerhalb der Basalganglien (BG), die maßgeblich an der Regulation und Kontrolle der Motorik beteiligt sind, aber auch sensomotorische, assoziative und limbische Informationen modifizieren (NAKANO et al. 2000). Die BG bestehen aus subkortikal gelegenen Kerngebieten, die funktionell miteinander verschaltet sind und sich im Bereich des Mittelhirns zwischen Kortex und Thalamus befinden (Abb. 3). Zu den anatomischen Anteilen der BG zählen der Nucleus (N.) caudatus, der N. lentiformis, der sich aus dem Putamen und dem Globus pallidus externus (GPe) und internus (GPi) zusammensetzt, und der N. accumbens. Betrachtet man die BG als funktionelles System, wird ihnen außerdem der N. subthalamicus (STN) und die Substantia nigra (SN) mit ihrer dorsalen pars compacta (SNc) und der ventral gelegenen pars reticularis (SNr) zugeordnet (TISCH et al. 2004). Die BG verstärken oder unterdrücken Bewegungsimpulse, die aus dem Kortex, wie dem präfrontalen Assoziationskortex, gesendet werden und leiten sie über den Thalamus an den motorischen Kortex weiter. Die Projektionsneurone im Striatum (N. caudatus und Putamen), die Informationen hirnarealübergreifend weiterleiten, machen 90 % aller Nervenzellen in den BG aus, Interneurone mit ihren kürzeren Axonen stellen etwa zehn % dieser Nervenzellen dar (PARENT und HAZRATI 1995, SMEETS et al. 2000). Abbildung 3A repräsentiert ein zur vereinfachten Übersicht häufig verwendetes Schema über die komplexen Regelkreise innerhalb der BG. Nach dieser Theorie gelangen Informationen aus dem Kortex über

glutamaterge Bahnen zum Striatum, der Eingangsstruktur der BG, die von dort über einen direkten oder indirekten Weg über den GPe und den STN zu den Ausgangsstrukturen der BG (GPi) weitergeleitet werden. Hemmende GABAerge (γ -Aminobuttersäure) Neurone projizieren von dort zum Thalamus, der wiederum erregende glutamaterge Informationen zum Kortex weiterleitet. Aus der SNc modulieren dopaminerge Neurone über D1-Rezeptoren den direkten, striato-nigralen Weg, der die Ausgangsstrukturen inhibiert, wodurch die hemmende Wirkung auf den Thalamus verringert wird, oder über D2-Rezeptoren den indirekten, striato-pallidalen Weg, sodass dieses inhibitorische Signal auf den Thalamus verstärkt wird. Dabei wird der GPe inhibiert, der wiederum hemmende Impulse an den STN weiterleitet. Dieser sendet exzitatorische glutamaterge Signalströme an den GPi und die SNr (JOEL und WEINER 1994, BOLAM et al. 2000, SMITH und KIEVAL 2000, CAZORLA et al. 2014). Aus diesen Signalwegen ergibt sich die Hypothese eines Gleichgewichtes beider Pfade. Ist diese Balance innerhalb der BG beeinträchtigt, resultieren daraus hyper- (z. B. Dystonie, Chorea Huntington) bzw. hypokinetische (z. B. PD) Bewegungsstörungen (SIAN et al. 1999, VITEK und GIROUX 2000). Bei der PD (Abb. 3B) führt der Verlust dopaminergischer Nervenzellen durch eine verminderte Aktivität des direkten und einer Aktivitätssteigerung des indirekten Weges vermutlich zu einer verstärkten Inhibition des Thalamus, woraus eine verminderte Erregung der thalamo-kortikalen Feedbackschleife resultiert. Dadurch werden kortikale Bewegungsprogramme nicht verstärkt und es ergeben sich Störungen der willkürlichen Bewegungskoordination (CROSSMAN 1989, GALVAN et al. 2015). Auch andere Neurone des dopaminergen Systems sind vom Zelluntergang betroffen, z. B. die Neurone des ventralen tegmental Areal. Der damit einhergehende Dopaminmangel in mesolimbischen und mesokortikalen Arealen ist wahrscheinlich für kognitive Defizite der PD-Patienten verantwortlich (JELLINGER 1991). Darüber hinaus wurden weitere Neurodegenerationen in anderen Hirnarealen gefunden, die mit Transmitterverlusten von Noradrenalin, Serotonin, Acetylcholin und GABA verbunden sind und ebenfalls nicht-motorische Symptome der Erkrankung erklären könnten (JELLINGER 1991, BRAAK und BRAAK 2000).

Ein zweites typisches Kennzeichen der Erkrankung sind histologisch nachweisbare eosinophile, endozytoplasmatische Einschlusskörperchen (EK), die sog. Lewy-Körperchen (Lewy bodies), die im Perikaryon vorkommen sowie die Lewy-Neuriten der Zellfortsätze (BRAAK und BRAAK 2000). Sie bestehen vor allem aus abnorm phosphorylierten Neurofilamenten, dem Protein Ubiquitin, das für den nicht-lysosomalen Abbau pathologisch veränderter Proteine benötigt wird, sowie einem Membranprotein, dem **α -Synuclein**. Neben der SN kommen sie auch in anderen zentralen und peripheren Regionen des Nervensystems vor (GIBB und LEES 1988). Ihre Funktion ist noch nicht vollständig geklärt, diskutiert werden sowohl neurodegenerative als auch neuroprotektive Effekte (FAHN und SULZER 2004). Allerdings finden sich die Lewy-Körperchen auch bei älteren, gesunden Menschen sowie bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen und sind somit nicht pathognomonisch

für die PD (GIBB und LEES 1988). Durch die Projektion des Thalamus zum primären motorischen, prämotorischen und supplementär-motorischen Kortex, kommt es auch in diesen Bereichen zu funktionellen Veränderungen (PICARD und STRICK 1996, HASLINGER et al. 2001, BUHMANN et al. 2003). Weiterhin gibt es Hinweise auf eine gestörte sensomotorische Integration (ABBRUZZESE und BERARDELLI 2003).

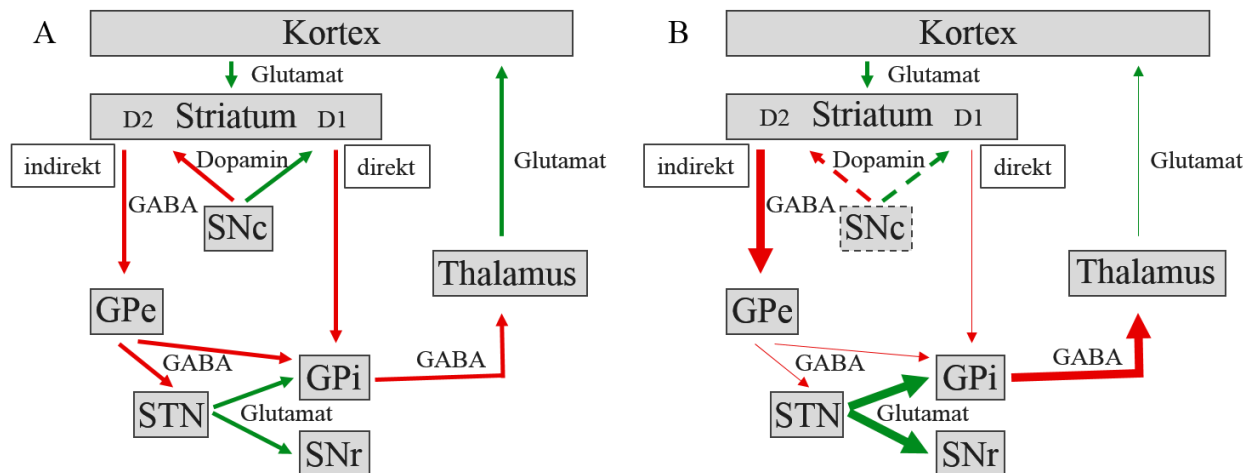


Abb. 3: Schema zur vereinfachten Übersicht über die Regelkreise innerhalb der Basalganglien. A zeigt den Zustand einer physiologischen motorischen Kontrolle, B stellt die pathophysiologischen Dysfunktionen im Parkinson-Patienten dar. Grüne Pfeile symbolisieren exzitatorische Signalwege, rote Pfeile stellen inhibitorische Signalwege dar. (D1: Dopamin-D1-Rezeptor, D2: Dopamin-D2-Rezeptor, GPe: Globus pallidus externus, GPi: Globus pallidus internus, SNc: Substantia nigra pars compacta, SNr: Substantia nigra pars reticulata, STN: N. subthalamicus). Modifiziert nach LANG und LOZANO (1998).

2.2.3 Therapie der Parkinson-Erkrankung

In den ersten Jahren der Erkrankung sind die motorischen Symptome meist erfolgreich mit dem Dopamin-Vorläufer L-DOPA (Levodopa, L-3,4-Dihydroxyphenylalanin), der die Blut-Hirnschranke im Gegensatz zum Dopamin passieren kann, therapierbar (AHLSSKOG 2009). Problematisch sind bei dieser Behandlung die im Laufe der Zeit zunehmenden dyskinetischen Nebenwirkungen, die vermutlich auf die kurze Halbwertszeit von L-DOPA und der damit verbundenen pulsatilen Dopamin-Rezeptor-Stimulation zurückzuführen sind, was zu postsynaptischen Umbauprozessen führt. Diese wiederum scheinen das L-DOPA-Langzeitsyndrom auszulösen, das neben den Dyskinesien durch Wirkungsfluktuationen gekennzeichnet ist (FAHN 1999, SCHRAG und QUINN 2000). Aus diesem Grund wird versucht, so spät wie möglich mit der L-DOPA-Therapie zu beginnen und zunächst Dopaminagonisten, wie z. B. Cabergolin oder Pramipexol, einzusetzen. Dem Abbau von Dopamin kann durch Applikation von MAO (Monoaminoxidase)-B- (z. B. Selegilin, Rasagilin) oder COMT (Catechol-O-Methyltransferase)-Hemmern (z. B. Tolcapon) entgegengewirkt werden. Insbesondere, wenn die Nebenwirkungen der medikamentösen Therapiestrategien den therapeutischen Nutzen übersteigen, kommen chirurgische Maßnahmen in Frage. In den 90er Jahren gewann die Tiefe Hirnstimulation an wachsender

Bedeutung (BENABID et al. 1987, POLLAK et al. 1993). Stimuliert wird bei der PD vor allem der STN, beim Auftreten von Dyskinesien auch der GPi (WILLIAMS et al. 2014). Ungeachtet dessen ist auch dieses Therapieverfahren mit Risiken, wie beispielsweise Krampfanfällen, Infektionen oder intrakraniellen Blutungen verbunden (DEUSCHL et al. 2006). Alle Therapieoptionen beschränken sich bislang auf symptomatische Maßnahmen. Um den progressiven Verlauf der Erkrankung aufzuhalten, müssen alternative Behandlungsstrategien und neuroprotektive Wirkstoffe entwickelt werden (SUCHOWERSKY et al. 2006). Für diesen Forschungsschwerpunkt sind Tiermodelle unverzichtbar.

2.2.4 Tiermodelle der Parkinson-Erkrankung

2.2.4.1 Übersicht und Einteilung etablierter Tiermodelle

Bis dato konnte keines der Parkinsonmodelle, die in verschiedenen Spezies generiert wurden, vom Fadenwurm, der Taufliede und dem Zebrafisch, über Nager (Maus, Ratte), Katzen und Hunde bis hin zu Primaten, den Anforderungen eines aussagekräftigen Tiermodells für das IPS (siehe 2.1.1) vollständig gerecht werden (LINK 2001, BLANDINI und ARMENTERO 2012). Das IPS scheint im Unterschied zum Menschen bei Tieren nicht spontan aufzutreten. Aus diesem Grund wurde mithilfe von pharmakologischen, experimentellen sowie genetischen Strategien versucht, im Tiermodell vergleichbare Merkmale zu erzeugen. Tabelle 1 gibt einen Überblick über einige bedeutende Tiermodelle und deren Parkinson-assoziierte Merkmale im Hinblick auf pathologische und verhaltensspezifische Veränderungen. Die induzierten Modelle haben in der Vergangenheit einen enormen Beitrag zur Entwicklung symptomatischer Therapien und zum pathogenetischen Verständnis der PD beigetragen. Daneben wurden in den letzten Jahren, ausgehend von den Erkenntnissen monogenetisch determinierter Parkinson-Syndrome, durch gezielte genetische Manipulation transgene und Knock-out (KO) Modelle (Nager, Invertebraten) erzeugt. Je nach Erbgang kann auf dieser Grundlage zwischen autosomal-dominanten und autosomal-rezessiven Tiermodellen unterschieden werden. Darüber hinaus wurden Gene spezifisch manipuliert, die in engem kausalen Zusammenhang mit der Pathophysiologie der PD stehen, wie beispielsweise Gene, die den Dopaminstoffwechsel beeinflussen (Nurr1, VMAT2, Pitx3), in die Mitochondrienfunktion involviert sind (Mitopark) oder an der Regulation der Immunantwort und des Zelltodes beteiligt sind (NF κ B) (LE et al. 2014). Trotz der zu vermutenden hohen „construct validity“ der generierten genetischen Modelle erscheinen die pathologischen und phänotypischen Charakteristika oftmals insuffizient (BLESA und PRZEDBORSKI 2014).

2.2.4.2 Das Thy1-aSyn Mausmodell

Das Protein α -Synuclein scheint eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie der PD zu spielen. Mutationen im SNCA (humanes Synuclein alpha)-Gen können familiäre Formen der

Literaturübersicht

| Tiermodell/ Gendefekt (Spezies) (Referenz/ Erstbeschreibung) | Pathologie | Verhalten |
|---|---|--|
| 1 Pharmakologische Tiermodelle | | |
| Reserpin (Ratte) (ROOS und STEG 1964) | ↓ Katecholaminspiegel | Akinese; Hypokinese; Tremor; Katalepsie |
| Haloperidol (Ratte) (HEFTI et al. 1985) | - | Katalepsie; Akinese; Bradykinese |
| 2 Neurotoxische Tiermodelle | | |
| Rotenon (Maus, Ratte) (BETARBET et al. 2000) | Degeneration des nigrostriatalen Systems; oxidative Schädigung; EK; ↓ Dopamin im STR | Rigor; Bradykinese; Haltungsanomalien; L-DOPA reversible Symptomatik |
| 6-OHDA, intrazerebral (Ratte) (UNGERSTEDT 1968) | dopaminerge Neurodegeneration (nicht progressiv) in der SN; oxidative Schäden und Apoptose; ↓ Dopamin im STR | Hypolokomotion; Akinese; Katalepsie; Rotationsbewegungen bei unilateralen Läsionen |
| MPTP (Maus, Ratte) (CHIUEH et al. 1984, HEIKKILA et al. 1985) | dopaminerge Neurodegeneration in der SN; noradrenerge Neurodegeneration im Locus coeruleus; ↓ Dopamin im STR; EK nach kontinuierlicher Applikation | Akinese; Katalepsie; Hypolokomotion |
| Paraquat (+ Maneb) (Maus, Ratte) (DI MONTE et al. 1986, THIRUCHELVAM et al. 2000) | EK; ↓ Dopamin im STR; Neurodegeneration in der SNc | Bradykinesie; Hypolokomotion |
| 3 Genetische Tiermodelle | | |
| 3.1 Autosomal-dominante Tiermodelle | | |
| WT α -syn, PDGF- β Promotor (Maus) (MASLIAH et al. 2000) | EK; keine Neurodegeneration; ↓ TH und Faserdichte (STR) | ↓ Performance auf dem Rotarod (zwölf Monate) |
| Thy1-aSyn* , mThy-1 Promotor (Maus) (ROCKENSTEIN et al. 2002) | EK; keine Neurodegeneration; ↓ Dopamin; ↓ Neurotransmitterfreisetzung der Projektionsneurone im STR; ↑ TNF α | Hyperaktivität (vier bis sieben Monate); motorische Dysfunktionen u.a. im Balkentest, „pole test“, kognitive Defizite, ↑ Angstverhalten; Hypolokomotion, Katalepsie, sensorische Defizite, Akinese (14 Monate) |
| A30P α -syn, mThy-1 Promotor (Maus) (NEUMANN et al. 2002) | sensomotorischer Zellverlust (Hirnstamm und Rückenmark); EK | bis hin zur Paralyse (acht bis zwölf Monate) |
| A53T α -syn, mPrP Promotor (Maus) (LEE et al. 2002) | nicht-dopaminergem Zellverlust (Hirnstamm, Rückenmark); EK; mitochondriale Dysfunktion | starke Defizite (zwölf Monate) |
| A30P/A53T α -syn, Rat TH Promotor (Maus) (RICHFIELD et al. 2002) | progressive dopaminergem Zellverlust; ↓ Dopamin und seine Metabolite; TH Axone morphologisch verändert; ↑ DAT (präsynaptisch); diffuses Synuclein in dopaminergen Neuronen | ↓ lokomotorische Aktivität (13 bis 23 Monate) |
| WT α -syn, A53T α -syn, CamKII-tTA (tet-off) Promotor (Maus) (NUBER et al. 2008) | Trend eines TH ⁺ -Zellverlust; kondensierte Mitochondrien und Fetttropfen; WT: Zelldegeneration im Hippocampus und der SN A53T: nicht-dopaminergem Neuronenverlust | ↓ Performance und motorisches Lernen auf dem Rotarod |
| LRRK2, R1441G, BAC Promotor (Maus) (LI et al. 2009b) | ↓ Dopaminübertragung (STR); ↓ Faserdichte (SNr); Neuritenfragmentierung (STR); ↑ Tau und phosphoryliertes Tau | ↓ Aufrichten |
| LRRK2-WT/GS/KD, CamKII-tTA (tet-off) | Golgi-Struktur Fragmentierung | keine Auffälligkeiten |

Literaturübersicht

| | | |
|--|--|---|
| Promotor (Maus) (WANG et al. 2008b) | | |
| LRRK2-R1441C, KI (Maus) (TONG und SHEN 2009) | veränderte D2-Rezeptor-Aktivität | ↓ Amphetamin-induzierte lokomotorische Aktivität |
| 3.2 Autosomal-rezessive Tiermodelle | | |
| Parkin (Maus) (GOLDBERG et al. 2003) | ↑ Dopamin (STR, limbisches System); ↓ Erregbarkeit striataler Neurone; ↓ DAT; ↓ VMAT2; ↓ mitochondriale und antioxidative Proteine im ventralen Mittelhirn | ↓ Willkür- und Amphetamin- induzierte lokomotorische Aktivität; Defizite beim Balkentest und bei der akustischen Schreckantwort |
| DJ-1 (Maus) (GOLDBERG et al. 2005) | ↑ Dopamingehalt, -Wiederaufnahme und stimulierte Dopaminausschüttung (STR); ↓ mitochondriale Peroxidase-Aktivität | ↓ lokomotorische Aktivität (altersabhängig); Defizite im „tape removal test“ (elf Monate) |
| PINK1 (Maus) (GAUTIER et al. 2008) | ↓ evozierte Dopaminausschüttung; ↓ Dopamingehalt (STR); vergrößerte Mitochondrien; ↓ Aconitase-Aktivität (STR) | Beeinträchtigung der spontanen Aktivität (altersabhängig) |
| 3.3 Weitere genetische Tiermodelle | | |
| Nurr1 KO (auch konditional) (Maus) (KADKHODAEI et al. 2009) | KO: Agenese dopaminerger Neurone (SN) konditionaler KO: progressive dopaminerger Neuronenverlust (SN); ↓ Dopamingehalt (STR) | ↓ lokomotorische Aktivität; ↓ Performance auf „pole test“ und Rotarod; ↑ Fußfehler im Gittertest; ↓ Aufrichten |
| Pitx3-aphakia (Maus) (LI et al. 2009a) | progressiver dopaminerger Neuronenverlust (SN); ↓ Dopamin-Gehalt (STR) | ↓ lokomotorische Aktivität; ↓ Performance auf „pole test“ und Rotarod |
| Mitopark (Maus) (EKSTRAND et al. 2007) | intraneurale Einschlüsse; ↓ nigrostriatale dopaminerge Neurodegeneration (geringgradig) | ↓ lokomotorisches Erkundungsverhalten; Tremor und Rigor (z. T.) |
| VMAT2-defiziente Mäuse (Maus) (TAYLOR et al. 2009) | progressiver dopaminerger Neuronenverlust (SN, STR); α-Synuclein-Aggregation; ↓ Olfaktion, Depression | ↓ lokomotorische Aktivität; ↓ Performance auf dem Balkentest; ↓ Schrittlänge |
| NFκB/c-Rel-defiziente Mäuse (Maus) (BAIGUERA et al. 2012) | fibrilläres α-Synuclein; ↑ Eisenablagerungen (SN, STR); reaktive Mikroglia, ↓ dopaminerge Neurodegeneration (geringgradig) | Defizite bzgl. Lokomotion und Gang; Bradykinese; Rigor |

Tabelle 1: Überblick zu einigen pharmakologischen, neurotoxischen und genetischen Nagermodellen der Parkinson-Erkrankung sowie einigen Befunden zur Symptomatik und Pathophysiologie. (*: in dieser Arbeit verwendetes Modell, ↓: vermindert, ↑: erhöht, 6-OHDA: 6-Hydroxydopamin, DAT: Dopamintransporter, EK: Einschlusskörperchen, MPTP: 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin, STR: Striatum, TH: Tyroxin-Hydroxylase, TNFα: Tumornekrosefaktor α, VMAT2: Vesikulärer Monoamin-Transporter Typ 2, WT: Wildtyp, α-syn: α-Synuclein) Modifiziert nach LEE et al. (2012), GERLACH et al. (2007) und LE et al. (2014).

PD auslösen, wobei akkumuliertes α-Synuclein auch beim sporadischen IPS zu finden ist, bei dem ätiologisch ein Zusammenwirken von Umweltfaktoren und Gendefekten, wie beispielsweise Polymorphismen im α-Synuclein-Gen vermutet wird (SPILLANTINI und GOEDERT 2000, GATTO et al. 2010). Die Thy1-aSyn Maus, die humanes Wildtyp-α-Synuclein unter dem Thy1-Promotor überexprimiert, stellt damit ein etabliertes Mausmodell für das IPS dar und wurde erstmals unter dem Namen „Linie 61“ (gemischter Hintergrund C57Bl6/DBA2) charakterisiert (ROCKENSTEIN et al. 2002). Im Unterschied zu der sog. „Linie D“, welcher ein anderer Promotor (PDGF, „Platelet Derived Growth Factor“) zugrunde liegt, ist die Proteinakkumulation hier weiter verbreitet vorzufinden, nämlich in Synapsen und

Neuronen im gesamten Gehirn, insbesondere im Thalamus, den Basalganglien, der SN und im Hirnstamm (DELENCLOS et al. 2014). CHESSELET et al. (2012) bieten einen ausführlichen Überblick über zum humanen Patienten vergleichbare pathologische Befunde sowie die Eignung des Mausmodells für die Forschung und Entwicklung neuartiger Therapieoptionen der PD. Im Folgenden werden die wichtigsten Charakteristika zusammengefasst. So konnte in diesem Tiermodell belegt werden, dass α -Synuclein in nigrostriatalen dopaminergen Neuronen exprimiert wird, wobei die Überexpression des Proteins nicht vor dem zehnten Tag post natal beginnt. Außerdem konnten Proteinase K-resistente α -Synuclein-Aggregate in zahlreichen Hirnarealen detektiert werden, deren Anzahl und Größe mit steigendem Alter zunehmen (ROCKENSTEIN et al. 2002). Ähnlich zum Patienten konnte vermehrt 129S-phosphoryliertes α -Synuclein im Striatum, der SN, dem Kortex und dem Hippocampus nachgewiesen werden. Auch im peripheren Nervensystem der Thy1-aSyn Maus, wie dem Plexus myentericus, akkumulierte das Protein (WANG et al. 2012). Obwohl im Modell ein progressiver Dopaminverlust im Striatum von 40 % mit einem Alter von 14 Monaten zu verzeichnen ist, konnte zu diesem Alter kein Zellverlust nachgewiesen werden (LAM et al. 2011). Die transgenen Mäuse weisen ab dem vierten Monat ein signifikant geringeres Körpergewicht auf, ab dem 14. Monat steigt die Mortalitätsrate, die durch Weichfutterapplikation und Stressvermeidung hinausgezögert werden kann. Der robuste Phänotyp der Tiere spiegelte sich besonders in motorischen Defiziten wider, die allerdings kaum in den weiblichen Tieren abgebildet werden konnten. Aus diesem Grund werden für die Versuche meist nur die Männchen verwendet, obwohl ein vergleichbarer striataler Dopaminverlust auch in den weiblichen Mäusen nachgewiesen wurde (LAM et al. 2011). Die Tatsache, dass sich das Transgen auf dem X-Chromosom befindet und zufällig ein X-Chromosom inaktiviert wird, könnte als Ursache für den phänotypischen Geschlechtsunterschied in Frage kommen. Mit 14 Monaten zeigen die männlichen Tiere Hypolokomotion im Offenfeld, Katalapsie im Block-Test und sensorische Defizite im „adhesive removal test“, die sich mit zunehmenden Alter verschlimmern und durch L-DOPA aufgehoben werden können. Hinzu kommen Symptome wie Akinese, eine gekrümmte Körperhaltung, vermindertes Putzverhalten und schlechtere Futteraufnahme. Dahingegen wurde bei vier bis sieben Monate alten männlichen Tieren eine Hyperaktivität beobachtet, die durch mit Mikrodialyse analysierte, erhöhte extrazelluläre Dopaminspiegel begründet wurde, welche auch bei LRRK2-Trägern der PD nachgewiesen werden konnten (SOSSI et al. 2010, LAM et al. 2011). Motorische Dysfunktionen konnten ab dem zweiten Lebensmonat der männlichen Mäuse im Balkentest, im „pole test“, im Nestbautest und im Zylinder-Test nachgewiesen werden (FLEMING et al. 2004). Auch frühzeitige, nicht-motorische Symptome wurden in diesem Mausmodell abgebildet, die die meisten Toxin-basierten Modelle nicht adäquat repräsentieren konnten (MCDOWELL und CHESSELET 2012). So wurden im Alter von drei und neun Monaten olfaktorische Beeinträchtigungen detektiert, außerdem eine abnorme Dickdarm-Motilität (mit zwölf Monaten), eine gestörte zirkadiane Rhythmik (mit drei bis zwölf Monaten), kognitive Defizite, gesteigertes Angstverhalten (mit vier Monaten)

sowie Beeinträchtigungen der Vokalisation (WANG et al. 2008a, KUDO et al. 2011, MAGEN et al. 2012, GRANT et al. 2014). In elektrophysiologischen Untersuchungen an striatalen Projektionsneuronen konnten bei den Tieren Hinweise für eine verminderte Neurotransmitterfreisetzung an der kortikostriatalen Synapse gefunden werden (WU et al. 2010). Auch inflammatorische Prozesse ließen sich im Mausmodell belegen. So waren in den transgenen Tieren eine Mikroglia-Aktivierung im Striatum und der SN sowie eine Erhöhung des Zytokins TNF α (Tumornekrosefaktor α) zu verzeichnen. Weitere Ähnlichkeiten zum Parkinson-Patienten zeigten sich in molekularen Veränderungen (SONG et al. 2004, RICHTER et al. 2014). In pharmakologischen Studien erwies sich das Modell als prädestiniert, um die Wirkung von Substanzen sowohl auf frühzeitige als auch auf späte motorische und nicht-motorische Symptome zu evaluieren (KOOB et al. 2010, LEE et al. 2011). Die oben genannten Befunde zum Verhalten und zur Pathophysiologie wurden hauptsächlich an männlichen Tieren erhoben.

2.3 Die DYT1 Knock-in (KI) Maus als Modell für eine generalisierte Dystonieform

2.3.1 Definition, Einteilung und Genetik von Dystonien

Als Dystonie wird eine sehr heterogene Gruppe neurologischer Syndrome bezeichnet, die durch anhaltende unwillkürliche Muskelkontraktionen, schraubenartige Bewegungsmuster und abnorme Körperhaltungen gekennzeichnet sind. Dystone Symptome gehen mit parallelen Kontraktionen agonistischer und antagonistischer Muskelgruppen einher und werden oft durch willkürliche Bewegungen initiiert oder verschlimmert (ALBANESE et al. 2013). Dystonien lassen sich den Dyskinesien zuordnen und spielen mit weltweit über drei Millionen Betroffenen eine bedeutsame Rolle (JINNAH und HESS 2008). Auch bei den Haustieren, insbesondere bei Hund, Pferd und Rind werden Dystonien beschrieben, deren veterinärmedizinische Bedeutung, möglicherweise aufgrund der erschwerten Diagnostik, unterschätzt wird (RICHTER et al. 2015). Hinsichtlich der klinischen Charakteristika (Achse I, s. Abb. 4) lassen sich Dystonien nach verschiedenen Kriterien, wie das Alter beim erstmaligen Auftreten der Erkrankung, die betroffene Körperregion, das zeitliche Muster und assoziierte Symptome einteilen. Ätiologisch (Achse II) können Dystonien anhand ihrer neuropathologischen Merkmale klassifiziert werden. Weiterhin unterscheidet man zwischen vererbten, erworbenen (z. B. als Folge von Medikamenten, wie Neuroleptika oder Toxinen, wie Kohlenstoffmonoxid) sowie den idiopathischen Formen der Dystonie. Für erstere sind über 20 verschiedene Gendefekte (DYT1 bis DYT25) identifiziert worden, wobei dem Großteil dieser monogenetischen Dystonien autosomal-dominante Erbgänge zugrunde liegen (ALBANESE et al. 2013).

Die verbreitetste genetische Dystonieform ist die **primäre DYT1-Torsionsdystonie**, die auf eine Mutation im DYT1-Gen zurückzuführen ist, das für das ubiquitär vorkommende Protein



Abb. 4: Einteilung der Dystonien anhand der klinischen Charakteristika (Achse I) sowie der Ätiologie (Achse II). Modifiziert nach ALBANESE et al. (2013).

TorsinA kodiert. Der Gendefekt besteht in einer Deletion dreier Basenpaare (Δ GAG), woraus der Verlust eines Glutamatrestes am carboxyterminalen Ende des Proteins resultiert (OZELIUS et al. 1997). Dieses gehört zur AAA⁺-Proteinfamilie (ATPasen assoziiert mit verschiedenen Zellaktivitäten), wurde im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums gefunden und scheint durch die Ähnlichkeit zu den Hitzeschock-Chaperonen eine Rolle bei der zellulären Stressantwort zu spielen (NEUWALD et al. 1999, KUNER et al. 2004). Obwohl über die Funktion des TorsinA noch wenig bekannt ist, geht man davon aus, dass es Aufbau und Struktur der Kernmembran und das Recycling von synaptischen Vesikeln mitreguliert (GOODCHILD und DAUER 2004, GRANATA et al. 2008). Die Erkrankung beginnt in den meisten Fällen zwischen dem fünften und 28. Lebensjahr an einer Extremität und neigt zur Generalisierung (OZELIUS und LUBARR 1993, BREAKFIELD et al. 2008). Nur selten bleibt die dystone Störung fokal (z. B. als Schreibkrampf) beschränkt (BRESSMAN et al. 2000). Mit einer unvollständigen Penetranz von ca. 30 bis 40 % gibt es zahlreiche symptomlose Träger des Gendefekts, was vermuten lässt, dass zusätzliche Faktoren, wie z. B. Umwelteinflüsse, Stress, oder weitere Genpolymorphismen multifaktoriell zur Ausprägung der Erkrankung beitragen (EDWARDS et al. 2003, BRESSMAN 2006).

2.3.2 Pathophysiologie der Dystonien

Bis heute ist die zugrunde liegende Pathophysiologie der verschiedenen Dystonieformen weitgehend unklar. Viele Befunde lassen allerdings schlussfolgern, dass die Symptome auf Dysfunktionen innerhalb der Basalganglien (BG) zurückzuführen sind. So wurden bei Patienten mit einer erworbenen, symptomatischen Dystonie Läsionen im Striatum, Putamen und GP gefunden (MARSDEN und QUINN 1990, BHATIA und MARSDEN 1994). Zudem treten Dystonien als Begleitsymptome weiterer Erkrankungen auf, die auf BG-Störungen zurückzuführen sind, wie der PD oder Chorea Huntington (LOUIS et al. 1999, TOLOSA und COMPTA 2006). Die beeinträchtigten Regelkreise der BG, die zu hyperkinetischen Symptomen führen, werden in der Literatur oft am Beispiel des Hemiballismus dargestellt, sind für die Erklärung der Dystonie jedoch wahrscheinlich zu stark vereinfacht. Danach wird der Thalamus durch eine verringerte Erregung des GPi enthemmt, was eine verstärkte Erregung thalamo-kortikaler Signalwege zur Folge hat (VITEK und GIROUX 2000). Die Theorie wird von den Erfolgen der Tiefen Hirnstimulation unterstützt, denn die Stimulation des GPi führt oftmals zu einer Verbesserung der Symptomatik (SCHADT et al. 2007). Diese wird allerdings ebenso durch Pallido- und Thalamotomien erreicht, weswegen veränderte Entladungsmuster dieser Strukturen in der Pathogenese vermutet werden (VITEK 2002). Auch Abweichungen der synaptischen Plastizität werden in der Pathogenese der Dystonie diskutiert (PETERSON et al. 2010, QUARTARONE und PISANI 2011). Weiterhin konnten sensomotorische Beeinträchtigungen in Form von veränderten Aktivitäten im sensomotorischen Kortex sowie Störungen der sensomotorischen Integration nachgewiesen werden (DEFAZIO et al. 2007, BREAKFIELD et al. 2008). Neben den BG scheinen auch weitere Hirnregionen an der Pathologie beteiligt zu sein, das sind neben Thalamus und Kortex auch das Cerebellum und der Hirnstamm (ALONGI et al. 2014). Untersuchungen mit funktioneller Bildgebung lassen vermuten, dass Dystonien hauptsächlich auf Dysfunktionen der Verschaltung zwischen diesen Gehirnstrukturen basieren und demnach auch als Netzwerk-Erkrankungen bezeichnet werden können (NEYCHEV et al. 2011). Des Weiteren wurden biochemische Imbalancen festgestellt, wobei sich die Untersuchungen hauptsächlich auf das dopaminerge System konzentrierten (BRAGG et al. 2011, GOODCHILD et al. 2013). Möglicherweise liegen diesen aber auch Störungen weiterer Neurotransmitter zugrunde, z. B. eine verminderte GABAerge Hemmung, welche bis heute allerdings wenig untersucht wurden (RICHTER und LOSCHER 1998, RICHTER und RICHTER 2014).

2.3.3 Therapie von Dystonien

Aufgrund der unaufgeklärten Pathophysiologie der Dystonien kann bislang, ausgenommen von einigen erworbenen Dystonieformen und der L-DOPA-responsiven Dystonie, keine kausale Therapie der Erkrankung erfolgen (JANKOVIC 2013). Dadurch bleibt die zumeist unbefriedigende Behandlung, die auf Verminderung der unwillkürlichen Bewegungen, Schmerzlinderung und Verbesserung der Lebensqualität der Patienten zielen, lediglich symptomatisch und empirisch (JANKOVIC 2009). Die Wahl der Medikamente hängt dabei

u. a. von der Form der Dystonie, dem Alter der Patienten und dem Risiko der Nebenwirkungen ab und muss individuell an die Betroffenen angepasst werden (JANKOVIC 2013). Verbessern sich die Symptome durch eine L-DOPA-Therapie, handelt es sich um eine L-DOPA-responsive Dystonie. In wenigen Fällen führen Dopaminagonisten zu einer Verbesserung der Symptomatik (LANG 1985). Auch antidopaminerge (z. B. Tetrabenazin) Substanzen sind gelegentlich wirksam, finden allerdings aufgrund ihres hohen Nebenwirkungsspektrums kaum Anwendung (JINNAH und HESS 2008). Segmentale und generalisierte Dystonien werden häufig mit Anticholinergika (z. B. Trihexyphenidyl) therapiert, die bei einschleichender Dosierung gut vertragen werden, in höheren Mengen aufgrund unerwünschter Begleiterscheinungen allerdings problematisch sind. Des Weiteren profitieren einige Patienten von Muskelrelaxantien, wie z. B. Benzodiazepinen und Baclofen (JANKOVIC 2006). Für fokale Erscheinungsformen, wie zervikale Dystonien oder Blepharospasmen, stellt die intramuskuläre Injektion des Botulinumtoxins das Mittel der Wahl dar. Durch die Hemmung der Acetylcholin-Ausschüttung an der neuromuskulären Endplatte kann es für ca. zwei bis drei Monate zur Linderung der Symptome führen (BRIN et al. 1987). Sprechen die Beschwerden nicht mehr auf medikamentöse Optionen an, müssen chirurgische Alternativen in Betracht gezogen werden, wie beispielsweise die Tiefe Hirnstimulation des GPi. Deren Anwendung muss durch das Risiko des Auftretens schwerwiegender Komplikationen jedoch genau abgewogen werden (HUH et al. 2010, THENGANATT und JANKOVIC 2014).

2.3.4 Tiermodelle für primäre Dystonien

2.3.4.1 Übersicht und Einteilung etablierter Tiermodelle

Für die Aufklärung pathophysiologischer Mechanismen von Dystonien und die Entwicklung geeigneter Therapieoptionen sind Tiermodelle unerlässlich. Aufgrund der Heterogenität des Erkrankungskomplexes kann ein Modell nie die vollständigen Charakteristika der Humanpatienten widerspiegeln. Vielmehr sollen sie dazu dienen, bestimmte Aspekte und Merkmale der Krankheit zu untersuchen und zu behandeln (RICHTER und RICHTER 2014). Insbesondere bei den idiopathischen Dystonieformen besteht die Anforderung einer sehr guten Charakterisierung der Modelle, wenngleich diese durch die unaufgeklärte Ätiopathogenese mit der Schwierigkeit einer genauen Beurteilung der „construct validity“ einhergeht. Es können phänotypische Tiermodelle von genotypischen oder ätiologischen Modellen unterschieden werden (JINNAH et al. 2008). Zu ersteren zählen sowohl die genetischen als auch die experimentell induzierten Formen. Aufgrund ähnlicher klinischer Symptome im Vergleich zum Patienten eignen sich diese eher für die Untersuchung pharmakologischer und pathophysiologischer Prozesse, die an der Ausprägung dieser Merkmale beteiligt sind, da die genetischen Veränderungen nicht mit denen der Betroffenen übereinstimmen. Demgegenüber können ätiologische Modelle nützlich für die Erforschung pathophysiologischer biochemischer, molekularer oder zellulärer Mechanismen bestimmter Dystonieformen sein, zumal ihnen die typisch dystonen Bewegungsstörungen oft fehlen

(WILSON und HESS 2013). In der nachfolgenden Tabelle (Tab. 2) sind ausgewählte Tiermodelle dieser Systematisierung mit einigen ihrer pathophysiologischen und phänotypischen Charakteristika dargestellt.

2.3.4.2 Das DYT1 Knock-in (KI) Mausmodell

Wie bereits erwähnt ist die DYT1-Mutation eine autosomal-dominant vererbte Dystonieform, die gekennzeichnet ist durch eine Trinukleotid-Deletion (Δ GAG) des Proteins TorsinA (OZELIUS et al. 1997). Im Gegensatz zu transgenen Mausmodellen mit Überexpression eines humanen mutierten TorsinA (SHARMA et al. 2005) trägt die DYT1 Δ GAG Knock-in (KI) Maus die Mutation im Maus-TorsinA, d.h. im körpereigenen Gen, reguliert durch den eigenen Promotor (MARTELLA et al. 2014). Da bei ersteren sowohl das humane als auch das unveränderte Maus-TorsinA exprimiert werden, ergibt sich durch den KI der Vorteil einer realistischeren Widerspiegelung der Auswirkungen der Genveränderung (höhere „construct validity“). Bei der Zucht von DYT KI Mäusen sterben homozygote Tiere perinatal, während sich heterozygote Merkmalsträger wahrscheinlich unbeeinflusst in ihrer Entwicklung zeigen (TANABE et al. 2012). Im Folgenden soll der aktuelle Forschungsstand zu dieser Mauslinie hinsichtlich pathophysiologischer neuronaler Veränderungen, phänotypischer Merkmalsausprägungen sowie neuropharmakologischer Untersuchungsergebnisse berücksichtigt werden. DANG und Mitarbeiter (2005) begannen mit der Charakterisierung der DYT1 KI Maus eines gemischten 129/SvJ x C57BL/6-Hintergrundes und konnten feststellen, dass striatale Dopamin- und DOPAC (Dihydroxy-Phenylacetat)-Level sowohl in den KI Mäusen als auch in den Wildtypen vergleichbar waren, währenddessen bei den Mutanten eine 27 %ige Reduktion an Homovanillinsäure, dem Abbauprodukt von Dopamin, zu verzeichnen war. Des Weiteren konnten in immunhistochemischen Analysen vermehrt Ubiquitin- und TorsinA- enthaltende Aggregate in Neuronen der Nuclei pontis in Hirnschnitten dieser Mäuse gefunden werden. 2012 zeigte diese Arbeitsgruppe, dass das Mausmodell Defizite in der synaptischen Plastizität aufweist, insbesondere einen Verlust der kortikostriatalen LTD (Langzeit-Depression) (DANG et al. 2012). Zudem konnte im Vergleich zum Wildtyp eine quantitativ geringere Expression von striatalen D2-Rezeptoren festgestellt werden, von deren Aktivierung die kortikostriatale LTD abhängig war. Nach der Applikation eines Calcium-Kanal-Liganden (FPL64176), der in Wildtypen Dystonie-ähnliche Körperhaltungen verursachen sollte, konnten anschließend im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant weniger dystone Bewegungsmuster bei den DYT1 KI Tieren beobachtet werden. YOKOI und Mitarbeiter (2015) konnten an Hirnschnitten der DYT1 KI Mäuse dieses Hintergrundstammes weiterhin verminderte striatale D1-Rezeptor-Bindungsaktivitäten und Proteinlevel (post-) translationalen Ursprungs nachweisen und schlussfolgerten dadurch auf Veränderungen des direkten Weges in den BG-Regelkreisen. Mikrostrukturelle Analysen an Hirnschnitten der Mutanten (sowohl gemischter 129/SvJ x C57BL/6-Hintergrund als auch reiner C57BL/6-Hintergrund) ergaben, dass das Cerebellum ca. fünf % größer war als bei den Kontrolltieren und in Golgi-histochemischen Untersuchungen wiesen Purkinjezellen dieser Mutanten

Literaturübersicht

| Tiermodell/ Gendefekt (Referenz/ Erstbeschreibung) | Spezies, Hintergrund | Genetische Ent- sprechung (Human- patient) | Phänotypische Merkmale | Pathophysiologische Merkmale |
|--|---|--|--|---|
| 1 Phänotypische Tiermodelle | | | | |
| 1.1 Genetische Modelle | | | | |
| dst ^{dt} (BPAG1 Deletion) (DUCHEN 1976) | Maus, B6C3, BALB/c, DBA/2 | unbekannt | generalisierte Dystonie; „Clasping“; Ataxie; Defizite auf dem Balkentest und dem vertikalen Gittertest; Hypoaktivität | ↓ GABA, Glutamat; Übererregbarkeit durch fehlenden inhibitorischen Input der Purkinjezellen; Degeneration in den Spinal- und Hirnnervenganglien, N. ruber, STR, peripheren Nerven |
| dt (Atcay Mutation) (LORDEN et al. 1992) | Ratte, Sprague Dawley | unbekannt | progressive generalisierte Dystonie; sterben vor dem 40. Lebenstag | Störungen der Purkinjezell- Synapse; gestörte Signalmuster der Kleinhirnrkerne; ↓ GABA _A - Rezeptor; kleinere Purkinjezellen |
| dt ^{sz} (LOSCHER et al. 1989) | Hamster, Syrischer Goldhamster | unbekannt | paroxysmale generalisierte Dystonie nach Stress; fehlende PPI | ↑ Aktivität striataler Projektionsneurone; ↑ LTP; ↓ BG- Output; GABAerge und dopaminerge Dysfunktionen; ↓ striatale GABAerge Interneurone |
| Tottering (Cacna1 Mutation) (FUREMAN et al. 2002) | Maus, C57BL/6J | unbekannt | Ataxie; fokale oder paroxysmale generalisierte Dystonie; Absenzen (EEG- Veränderungen); induzierbar mit Koffein | ↓ Dopamin-Überschuss während der Dystonie; ↓ evozierte Glutamat- Ausschüttung |
| 1.2 Experimentell induzierte Modelle | | | | |
| 3-Nitropropionsäure (OUARY et al. 2000, FERNAGUT et al. 2002) | Maus, Ratte | entfällt | Dystonie des Rumpfes und der Gliedmaßen; „Clasping“ | Degeneration im STR und partiell in der SNc; dosisabhängige Letalität |
| 6-OHDA-Injektion (SN) (+ partielle Läsion des Nervus facialis) (PEARCE et al. 1995) | Maus, Ratte | entfällt | L-DOPA-induzierbare Dyskinesien mit dystonen Störungen; (Bepharospasmus) | ↓ striatales Dopamin |
| 2 Ätiologische Tiermodelle | | | | |
| ΔGAG TOR1A (hemizygot, CMV- Promotor) (SHARMA et al. 2005) | Maus, C57BL/6J | DYT1 | Fehler auf dem Balkentest; Hypolokomotion; Gangabweichungen; beeinträchtigt Lernen auf dem Rotarod | ↓ Amphetamin-Antwort; ↑ Dopamin-Umsatz; ↓ D2- Rezeptor-Proteinexpression; ↓ synaptische Plastizität |
| ΔGAG TOR1A (heterozygot, NSE- Promotor) (SHASHIDHARAN et al. 2005) | Maus, C57BL/6J | DYT1 | „Clasping“; anhaltende Kontraktionen; Hyperaktivität; „Circling“; Gangabweichungen | ↓ Dopamin-Umsatz; ↓ Impulsfrequenz des GP; ↑ Hemmung und somato- topische Desorganisation des GP; ↓ Dopamin-Ausschüttung; EK im PPN |
| ΔGAG TOR1A KI* (heterozygot) (DANG et al. 2005, GOODCHILD et al. 2005) | Maus, 129, gemischt mit C57BL/6J; C57BL/6J | DYT1 | Hyperaktivität; Gangabweichungen; Fehler auf dem Balkentest; PPI normal; ↑ Angstverhalten | ↑ und ↓ HVA; ↓ Dopamin im Mittelhirn und extrazellulär; ↓ TH-Neurone in der SNc; mikrostrukturelle Veränderungen im STR; Proteinaggregate im Pons; ↑ Ach-Freisetzung |

Literaturübersicht

| | | | | |
|--|---------------------------------|-------|--|--|
| ΔGAG oder humanes WT TOR1A (heterozygot, Maus-Prion-Promotor) (GRUNDMANN et al. 2007) | Maus, C57Bl/6N | DYT1 | Fehler auf dem Balkentest; Gangabweichungen; Hyperaktivität; beeinträchtigt Lernen auf dem Rotarod | ↓ Dopamin, Serotonin, 5-HIAA; EK im Hirnstamm; strukturelle Veränderungen der Kernmembran |
| ΔGAG oder humanes WT TOR1A (heterozygot, phTH-Promotor) (PAGE et al. 2010) | Maus, C57Bl/6J | DYT1 | Fehler auf dem Balkentest; Katalepsie nach Kokain | ↓ Dopamin und DOPA; ↑ Kokain-Antwort |
| ΔGAG oder humanes WT TOR1A (hemizygot, humaner TorsinA-Promotor) (GRUNDMANN et al. 2012) | Ratte, Sprague-Dawley | DYT1 | Fehler auf dem Balkentest; beeinträchtigte motorische Fähigkeiten auf dem Rotarod; „Clasping“; Gangabweichungen der Hintergliedmaßen | keine LTD-Induktion der Projektionsneurone und nach Stimulation glutamaterger Interneurone; strukturelle Veränderungen der Kernmembran |
| Pst (SATO et al. 2008) | Maus | DYT5 | progressives „Clasping“ der Hintergliedmaßen | ↓ TH und BH4; TH-Proteinverlust zuerst in Striosomen |
| Gch (ZENG et al. 2004) | Maus, C57Bl | DYT5 | - | ↓ TH, BH4, Dopamin; ↓ NO-Generation; ↑ D2-Rezeptor-Bindung |
| Pnkd (mutiert oder WT, Maus-Pnkd-Promotor) (LEE et al. 2012a) | Maus | DYT8 | Koffein- und Ethanol-induzierte Dyskinesien | c-Fos-Induktion in GP, STR und SNr nach Coffein und Ethanol; ↑ D1- und D2-Rezeptor, DAT, MAO-B |
| Scge KO (heterozygot, paternale Linie) (YOKOI et al. 2006) | Maus, gemischt mit C57Bl/6J | DYT11 | Fehler auf dem Balkentest; Myoklonus; Hyperaktivität; beeinträchtigt Lernen auf dem Balkentest; ↑ Angst- und Depressionsverhalten | ↑ Dopamin, DOPAC, HVA; ↑ D2-Rezeptor; strukturelle Veränderungen der Kernmembran in Projektionsneuronen und Purkinjezellen |
| Atp1a3 KO (heterozygot) (MOSELEY et al. 2007) | Maus, 129/Black Swiss, C57Bl/6J | DYT12 | Fehler auf dem Balkentest und Rotarod; C57Bl/6J-Hintergrund: ↑ motorische Fähigkeiten auf Rotarod und im Balkentest; ↑ Depressionsverhalten; ↓ räumliches Lernen; sensorische Defizite im Schwanzbewegungstest | verändertes Dopamin-Serotonin-Verhältnis unter Stress im Offenfeld; ↑ inhibitorische synaptische Übertragung auf Purkinje-Zellen |

Tabelle 2: Überblick zu einigen phänotypischen und ätiologischen Tiermodellen der Dystonie sowie einigen Befunden zur Symptomatik und Pathophysiologie. (*: in dieser Arbeit verwendetes Modell, ↓: vermindert, ↑: erhöht, 5-HIAA: 5-Hydroxyindolyllessigsäure, Ach: Acetylcholin, BH4: 5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin, DAT: Dopamintransporter, DOPAC: Dihydroxy-Phenylacetat, EEG: Elektroenzephalografie, EK: Einschlusskörperchen, HVA: Homovanillinsäure, NO: Stickstoffmonoxid, PPN: Nucleus pedunculo pontinus, STR: Striatum, WT: Wildtyp) Modifiziert nach RICHTER und RICHTER (2014) und WILSON und HESS (2013).

dünnere Dendriten sowie geringere und weniger komplexe dendritische Fortsätze auf (ZHANG et al. 2011, SONG et al. 2014). Weiterhin ergaben neurochemische Messungen im

Striatum und Mesencephalon der DYT1 KI Mäuse (C57BL/6-Hintergrund) geringgradige Abweichungen des Dopamingehaltes oder seiner Metabolite, wohingegen ein deutlicher Abfall von extrazellulärem und Amphetamin-stimuliertem Dopamin im Caudoputamen durch Mikrodialyse nachgewiesen werden konnte (SONG et al. 2012). Außerdem wurden TH-positive Neurone der SN in Mutanten dieses reinen Hintergrundstammes untersucht, die die Tendenz einer reduzierten Anzahl sowie eines vergrößerten Volumens zeigten. Mittels Positronen-Emissions-Tomografie und diffusionsgewichteter Magnetresonanztomografie konnte eine signifikant reduzierte fraktionelle Anisotropie im Striatum der DYT1 KI Mäuse festgestellt werden, die mit einer verringerten Anzahl an thalamostriatalen Bahnen korrelierte (ULUG et al. 2011). Mikroanatomische Untersuchungen ergaben darüber hinaus, dass kein deutlicher Verlust striataler Neurone bei drei bzw. sechs Monate alten Mäusen nachweisbar war (SONG et al. 2013). Cholinacetyltransferase- und Parvalbumin-positive Interneurone im Striatum waren allerdings größer als bei den Kontrolltieren, während NO-Synthase-positive Interneurone im Vergleich zur Kontrollgruppe kleiner erschienen. Die Projektionsneurone wiesen geringgradig dünnere und weniger Dendriten sowie dendritische Fortsätze auf. In Nervenzellkulturen aus dem Striatum, dem motorischen Kortex und dem Hippocampus der Mutanten war TorsinA nicht in präsynaptischen Nervenendigungen von Neuronen des ZNS nachweisbar, weder in den Wildtyp- noch in den KI-Gehirnen, obwohl es im Soma und im proximalen Dendrit auffindbar war (KOH et al. 2013). In Zellkulturen aus dem Hippocampus wurde in einer weiteren Arbeit nach Elektrostimulation eine Depolarisation der Neurone und eine Erhöhung der dendritischen Calcium-Konzentration erzeugt, die daraufhin wieder zum Ausgangslevel abfiel (IWABUCHI et al. 2013a). Der Scheitelwert schien unbeeinflusst, jedoch war in den heterozygoten Mäusen die Abfall-Phase verlängert. Dieser Effekt wurde durch Antagonisten des ionotropen Glutamaterezeptors aufgehoben, was dessen Existenz und Einfluss in den Neuronen bestätigte. Zudem wurde untersucht, ob die DYT1-Mutation der KI Maus die Erregbarkeit striataler GABAerger Neurone modifiziert (IWABUCHI et al. 2013b). Die heterozygoten Neurone zeigten dabei einen Anstieg des Scheitelwertes der Calcium-Konzentration infolge elektrischer Stimulation. In ultrastrukturellen Untersuchungen zur Aufklärung der Funktion von TorsinA enthielten Nervenzellen homozygoter KI Mäuse abnorme, läsionierte Kernmembranen, während nicht-neuronale Zelltypen unverändert erschienen (GOODCHILD et al. 2005). In einer weiteren Arbeit konnte in striatalen Projektionsneuronen durch Hochfrequenzstimulation keine LTD ausgelöst werden, während die LTP (Langzeit-Potenzierung) einen Anstieg der Amplitude aufwies (MARTELLA et al. 2014). Niedrigfrequenzstimulation führte nicht zu einer Depotenzierung kortikostriataler Synapsen. Weiterhin wurde beobachtet, dass eine Blockade von D2-Rezeptoren zu einer gesteigerten, zu den heterozygoten Mutanten vergleichbaren LTP in den Kontrolltieren führte und außerdem das Potenzierungslevel beider Gruppen normalisierte. Durch eine Blockade muskarinerger M1-Rezeptoren ließen sich die Defizite der Plastizität verhindern. Zudem konnte ein Missverhältnis in der dopaminergen und cholinergen Signalübertragung im

Striatum festgestellt werden. Die Aktivierung von D2-Rezeptoren führte zu einer paradoxen exzitatorischen Antwort cholinergischer Interneurone.

Obwohl bislang keine dem Menschen ähnliche typische Dystonie-Symptomatik in diesem wie in allen anderen DYT1-Modellen beobachtet werden konnten, wurden in einigen Publikationen **motorische Defizite und verhaltensspezifische Beeinträchtigungen** bei DYT1 KI Mäusen in verschiedenen Testanalysen detektiert. DANG et al. (2005) konnten bei den Mutanten des 129/SvJ x C57BL/6-Stammes Fehler auf dem Balkentest feststellen. Im Offenfeld-Test zeigten sich die sechs Monate alten, nicht aber die drei Monate alten Tiere hyperaktiv und mit abnormen Gangfolgen. Außerdem wurde ein Geschlechtsdimorphismus beobachtet: weibliche Mutanten ließen geringgradigere Abweichungen in den Verhaltensanalysen erkennen. Bei den DYT1 KI Tieren des reinen C57BL/6-Hintergrundes konnten SONG et al. (2012) keine offensichtlichen motorischen Beeinträchtigungen im Vergleich zu den Wildtypen feststellen. In Untersuchungen zum Einfluss des genetischen Hintergrunds der Tiere auf ihr phänotypisches Erscheinungsbild wurden drei verschiedene Stämme in homozygoten und heterozygoten Mäusen verglichen und eine Beeinflussung der Lebenserwartung festgestellt (TANABE et al. 2012). Der Stamm C57BL/6J verringerte diese in den Homozygoten signifikant, in heterozygoten Tieren jenes Hintergrundes konnten allerdings keine motorischen Auffälligkeiten beobachtet werden. Dahingegen verlängerte der DBA/2J- und CD1-ICR-Stamm die Lebenserwartung der Tiere. Hinsichtlich nicht-motorischer Charakteristika dieser Tiere wurde ein geringgradig erhöhtes Angstverhalten, allerdings kein Depressions-ähnliches Verhalten bei den Mutanten (129/SvJ x C57BL/6-Hintergrund) beobachtet (YOKOI et al. 2009). Dafür wurden Testapparaturen wie das „elevated-plus maze“, das Offenfeld, die Hell-Dunkel-Box, der „tail suspension test“ sowie der „forced swim test“ genutzt. Im Präpulsinhibitionstest waren ungestörte sensomotorische Funktionen in der KI- sowie der Kontrollgruppe nachweisbar. Weiterhin konnten in anatomischen Untersuchungen eine erhöhte Anzahl an c-fos-positiven Zellen im Hippocampus nachgewiesen werden sowie eine geringere Größe des zentralen Kerns der Amygdala, was auf ein verstärktes Angstgedächtnis der KI Mäuse hindeutet. Zudem weisen Verhaltensanalysen in den DYT1 KI Tieren dieses gemischten Hintergrundstammes auf eine beeinträchtigte Übertragung motorischer Fähigkeiten hin, wenn ein Verhaltenstest auf einen anderen Test folgt. So konnten Wildtyp-Mäuse ihre Leistung auf dem Rotarod durch ein vorangegangenes Training auf dem Laufband verbessern, während die Mutanten nicht von diesem Training profitierten (YOKOI et al. 2015).

In **pharmakologischen Untersuchungen** wurde die Wirkung des Anticholinergikums Trihexyphenidyl in den DYT1 KI Mäusen (129/SvJ x C57BL/6-Hintergrund) analysiert, welches zum einen die motorischen Defizite auf dem Balkentest aufheben konnte, zum anderen war die Substanz in der Lage, die reduzierte kortikostriatale LTD der DYT1 KI Tiere rückgängig zu machen (DANG et al. 2012). Scopolamin, ein Antagonist muscarinischer Acetylcholin-Rezeptoren, GBR1290, welches die Dopaminwiederaufnahme hemmt sowie der

D2-Rezeptor-Agonist Quinpirol hatten keine Auswirkungen bei den Mutanten des C57BL/6-Hintergrundes im Offenfeld-Test (TANABE et al. 2012). Auch SONG et al. (2012) fanden bei sechs Monate alten heterozygoten KI und Wildtyp-Mäusen desselben reinen Hintergrundstammes durch Amphetamin und Haloperidol keine Genotyp-spezifischen Effekte. Ausgehend von dem Sachverhalt, dass in verschiedenen DYT1-Modellen D2-Rezeptoren einen abnormalen exzitatorischen Effekt in cholinergen Interneuronen erzeugen, konnte in elektrophysiologischen Untersuchungen gezeigt werden, dass negative allosterische Modulatoren des metabotropen Glutamat Rezeptors 5 den abnormen Membranantworten sowie dem Dopamin- und Quinpirol-induzierten Calcium-Anstieg entgegenwirken (SCIAMANNA et al. 2014). Aus dieser Arbeit resultierte weiterhin, dass abnorme D2-Rezeptor-Antworten durch PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase)-Inhibitoren verhindert werden, während Phospholipase C- und Proteinkinase C-Inhibitoren keine Auswirkungen hatten. Kürzlich zeigten elektromyographische Untersuchungen an DYT1 KI Mäusen, im Unterschied zu Wildtypen des gemischten Hintergrundstammes, anhaltende Kokontraktionen des Musculus rectus und biceps femoris, die sich durch die Applikation von Trihexyphenidyl normalisierten (DEANDRADE et al. 2016).

2.4 Fragestellungen der vorliegenden Arbeit

Um Aussagen über die Eignung von Tiermodellen für neurologische Erkrankungen des Bewegungsapparates treffen zu können, bedarf es einer sorgfältigen Phänotypisierung. Für die Beurteilung von Verhaltensabweichungen wurden vielfältige Tests etabliert (s. 2.1.2). Moderate Beeinträchtigungen der Sensomotorik, die bei Parkinson- und Dystoniepatienten beobachtet wurden, können mit diesen Tests allerdings nicht immer zuverlässig erfasst werden. In der vorliegenden Arbeit sollte daher zunächst ein neuer sensomotorischer Verhaltenapparat konstruiert werden. Dieser sog. adaptive rotierende Balkentest (ARB-Test, „adaptive rotating beam test“) sollte unter Einbeziehung der sensomotorischen Integration sensitiv genug sein, um dezente Verhaltensdefizite in zwei Mausmodellen für neurologische Bewegungsstörungen aufzudecken, die bisher keine motorischen Beeinträchtigungen in Verhaltensstudien zeigten.

Die transgene Thy1-aSyn Maus spiegelt zahlreiche pathomorphologische Charakteristika der PD wider und stellt ein geeignetes Modell für die Erkrankung dar. Robuste motorische Defizite wurden bislang allerdings lediglich in den männlichen Tieren nachgewiesen, was auf die Lokalisation des Transgens auf dem X-Chromosom zurückgeführt wurde (CHESSELET et al. 2012). Zur Aufdeckung motorischer Beeinträchtigungen in den weiblichen Tieren und damit des Endophänotyps dieses Modells, sollte das Verhalten von drei bis sechs Monate alten transgenen Thy1-aSyn Mäusen beider Geschlechter auf dem neuen ARB-Test analysiert und mit den Ergebnissen auf etablierten motorischen Verhaltenstests („challenging beam test“, „pole test“) verglichen werden. Um den Einfluss des genetischen Hintergrundes der Tiere auf die motorischen Funktionen bezüglich des neuen ARB-Test zu analysieren, wurden

männliche und weibliche Wildtyp-Mäuse einer reinen C57BL/6J-Linie sowie Hybrid-Tiere des Stammes C57Bl/6J × DBA2 (BDF1) derselben Altersgruppen auf diesen drei beschriebenen Apparaturen getestet. Zur Quantifizierung der Expression von humanem Wildtyp- α -Synuclein wurde außerdem die mRNA-Expression von α -Synuclein in der SN mithilfe der quantitativen Echtzeit-PCR (qPCR) in sieben bis neun Wochen alten männlichen und weiblichen Thy1-aSyn Tieren untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Behavioural Brain Research publiziert (GERSTENBERGER et al. 2016).

Trotz ihrer hohen „construct validity“ mangelt es den genetischen Mausmodellen für die DYT1-Torsionsdystonie des Menschen, wie der DYT1 KI Maus, an einem motorischen Phänotyp (BRESSMAN et al. 1994). Da durch die unvollständige Penetranz der Erkrankung nur etwa 30 % der Genträger dystone Symptome entwickeln, könnte die heterozygote DYT1 KI Maus die nicht-dystonen Gendefektträger repräsentieren (RICHTER und RICHTER 2014). Ausgehend von Befunden an Dystoniepatienten, die Störungen der sensomotorischen Integration auch bei nicht-dystonen Gendefekt-Trägern zeigten und dadurch einen zugrundeliegenden Endophänotyp vermuten lassen, sollten am DYT1 KI Mausmodell (reiner C57BL/6-Hintergrund) sensomotorische Verhaltenstests durchgeführt werden, bei denen die Integration sensorischer Informationen für die korrekte Ausübung der motorischen Aufgabe erforderlich ist (TINAZZI et al. 2002, SCOTT et al. 2003, TINAZZI et al. 2003, FIORIO et al. 2007). Dazu wurden an drei bis sechs Monate alten männlichen KI Tieren und Wildtypen (Kontrollgruppe) zunächst eine Reihe etablierter Verhaltenstests, einschließlich des sensomotorischen „adhesive removal tests“ sowie der neue ARB-Test durchgeführt. Die Ergebnisse der Untersuchungen bei der DYT1 KI Maus sind in dem Journal Behavioural Brain Research veröffentlicht (RICHTER et al. 2016).

3 Publikation 1

Gerstenberger J, Bauer A, Helmschrodt C, Richter A, Richter F. The novel adaptive rotating beam test unmasks sensorimotor impairments in a transgenic mouse model of Parkinson's disease. Behavioural Brain Research. 2016;304:102-10

Der neue adaptive rotierende Balkentest bringt sensomotorische Beeinträchtigungen in einem transgenen Mausmodell für die Parkinson Erkrankung zum Vorschein

Eigenanteil der Publikation:

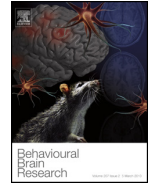
Folgende Aufgaben und Untersuchungen, die Bestandteil der nachfolgenden Publikation sind, wurden von mir persönlich durchgeführt:

- Zucht, Pflege und Genotypisierung der Versuchstiere
- Erstellung und Organisation der Versuchspläne
- Etablierung der Verhaltenstests am Institut
- Gehirnentnahme, Probenaufbereitung und Durchführung der quantitativen Echtzeit-PCR
- Entwicklung des Protokolls für den adaptiven rotierenden Balkentest (ARB-Test)
- Durchführung und statistische Auswertung aller Verhaltensversuche
- Verfassen von Teilen des Manuskripts der Publikation (insbesondere die Abschnitte Material, Methoden und Ergebnisse)

Die Aufgaben der weiteren Autoren der Veröffentlichung bestanden v. a. in der Vorgabe der Zielsetzung und der Leitung und Betreuung der Projekte (Prof. A. Richter, Dr. F. Richter), der Unterstützung bei der Zucht, Pflege und Genotypisierung der Tiere (A. Bauer) sowie der Assistenz bei den Verhaltensversuchen (A. Bauer) und der Durchführung und Auswertung der quantitativen Echtzeit-PCR (Dr. C. Helmschrodt). Weiterhin wurde an der statistischen Auswertung der Experimente (Dr. F. Richter) und der Erstellung und Korrektur des Manuskriptes (Prof. A. Richter, Dr. F. Richter) mitgewirkt.

Tierversuche:

Die durchgeführten tierexperimentellen Versuche wurden von der Landesdirektion Sachsen (Dienststelle Leipzig: Braustraße 2, 04107 Leipzig) in dem Antrag auf Genehmigung eines Versuchsvorhabens gemäß § 8 Tierschutzgesetz unter der Registriernummer TVV 20/13 mit dem Titel „Untersuchungen an Mausmodellen für Bewegungsstörungen: Phänotypisierung und Entwicklung neuer Therapieansätze“ am 26.07.2013 genehmigt.



Research report

Sensorimotor tests unmask a phenotype in the DYT1 knock-in mouse model of dystonia



Franziska Richter (DVM, PhD)^{a,*}, Julia Gerstenberger (DVM)^{a,1}, Anne Bauer (DVM)^a, Chun-Chi Liang (PhD)^b, Angelika Richter (DVM, PhD)^{a,*}

^a Institute of Pharmacology, Pharmacy and Toxicology, Department of Veterinary Medicine, Leipzig University, An den Tierkliniken 15, 04103, Leipzig, Germany

^b Department of Neurology and Department of Cell and Developmental Biology, University of Michigan Medical School, Ann Arbor, MI, USA

HIGHLIGHTS

- We established a behavioural readout for neuronal dysfunction in DYT1 KI mice.
- DYT1 KI mice exhibited sensorimotor deficits in the adhesive removal test.
- Deficits were detected in a complex rotating beam test with changing sensory input.
- Deficits may reflect previously shown cerebellothalamocortical tract alterations.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 September 2016

Received in revised form 13 October 2016

Accepted 17 October 2016

Available online 18 October 2016

Keywords:

Torsion dystonia

Genetic model

Sensorimotor impairments

Endophenotype

ABSTRACT

Hereditary generalized dystonia is often caused by a GAG deletion in *TOR1A* (*DYT1*) that encodes for the protein torsinA. Although mutation carriers show alterations in neuronal connectivity and sensorimotor deficits, only 30% develop dystonia. Uncovering the factors triggering the dystonic symptoms and underlying pathophysiology would greatly benefit the development of more effective therapies. In DYT1 knock-in (KI) mice, the expression of torsinA mutant alters the connectivity of neurons and the function of striatal cholinergic interneurons. We aimed to determine if heterozygous DYT1 KI mice exhibit deficits in behavioural tests that explore the connectivity of the sensory and motor system. DYT1 KI mice were tested in cognitive tests and challenging motor paradigms, followed by the adhesive removal test and the adaptive rotating beam test which both require sensorimotor integration. DYT1 KI mice did not exhibit cognitive deficits and were able to perform similarly to wild type mice even in challenging motor tests with relatively stable sensory input. Conversely, DYT1 KI mice spent more time on sensing and removing an adhesive sticker from the back of the nose; they exhibited difficulty to traverse rotating rods, especially if the surface was smooth and the diameter small. Our observations further support a role of sensorimotor integration in manifestation of this movement disorder. Future studies in DYT1 KI mice will explore the involved neurocircuitry and underlying molecular mechanisms.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

Abbreviations: DYT1 KI, knock in mouse model of DYT1 dystonia; ARB, adaptive rotating beam.

* Corresponding authors.

E-mail addresses: franziska.richter@vmf.uni-leipzig.de (F. Richter), julia.gerstenberger@vetmed.uni-leipzig.de (J. Gerstenberger), anne.bauer@vetmed.uni-leipzig.de (A. Bauer), chunchi@med.umich.edu (C.-C. Liang), angelika.richter@vetmed.uni-leipzig.de (A. Richter).

¹ These authors contributed equally to this work.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2016.10.028>
0166-4328/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Dystonia is a movement disorder characterized by sustained or intermittent muscle contractions, often initiated or worsened by voluntary action. For the inherited forms, a growing number of genes have been assigned a DYT designation [1]. DYT1 torsion dystonia is caused by a GAG deletion in *TOR1A*, which encodes for the chaperone like protein torsinA. However, only about 30% of the mutation carriers develop clinically overt dystonia, whereby the contributing factors to this reduced penetrance are poorly understood [2]. Sensory abnormalities and specifically deficits in sensorimotor integration are increasingly recognized in patients

which is the major protein implicated in the pathogenesis of PD. Alpha-synuclein aggregates are the primary component of Lewy bodies, a pathological hallmark of this disease [2]. Multiplication of the alpha-synuclein gene causes familial PD while polymorphisms increase the risk of sporadic PD [3,4]. Various transgenic alpha-synuclein mouse models are available and the most robust phenotypes were described in models with several fold overexpression of the human protein [1,5]. This is consistent with the gene dosage effect on disease onset and severity described in PD patients with multiplications of the alpha-synuclein gene [6]. Male mice overexpressing human wildtype alpha-synuclein under the Thy-1 promoter (Thy1-aSyn mice), an animal model of synucleinopathies such as PD, develop robust motor and non-motor deficits, proteinase K resistant alpha-synuclein aggregation at 2–3 months of age and a 40% DA loss at 14 months of age [7]. At 22 months of age tyrosine-hydroxylase positive neurons in the substantia nigra are significantly decreased in diameter and the mice show rapidly declining general health making it difficult to study even older animals for a loss of neurons [7]. Conversely, females of this line do not show these early motor deficits which is thought to be related to the lower expression of human alpha-synuclein due to random inactivation of the X chromosomally expressed transgene [7]. Interestingly, female Thy1-aSyn mice exhibit altered DA modulation of synaptic activity similar to the male counterparts [8–10]. This disconnection between pathophysiological alterations and motor phenotype is a common issue in genetic mouse models of movement disorders [1,11] and may be the result of compensatory mechanisms in rodents. For this reason there is a need for more sensitive tests.

Behavioral tests in rodent models often aim to test a specific feature, for instance motor dysfunction, by reducing any factors with deviating influence such as anxiety, grip strength or fluctuating sensory input. However, recent studies in PD patients show that somatosensory abnormalities contribute to the motor symptoms. Loss of response specificity to sensory information produces incorrect output signals from the basal ganglia for the preparation and execution of voluntary movement [12]. This sensorimotor deficit would unmask if motor performance needs to be adapted according to changing sensory (e.g. tactile, proprioceptive, vestibular) stimuli. We therefore hypothesize that motor deficits in animal models of movement disorders would increase if sensorimotor integration is required. Here we introduce a novel adaptive rotating beam test which requires sensorimotor integration (the use of sensory information to guide movement) that was sensitive to unmask motor deficits in female Thy1-aSyn.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Animal care was provided in accordance with the guidelines of the EU Directive 2012/63/EU and the German Animal Welfare Agency and experiments were approved under protocol numbers TVV20/13. Mice used in this study were bred and housed in the institute's facility. The employed well characterized model of PD overexpresses human wildtype alpha-synuclein under the murine Thy-1 promoter (Thy1-aSyn mice) on a mixed hybrid C57Bl/6J × DBA2 (short BDF1) background [7]. Transgenic mice and wildtype littermates were tested on the same day in randomized sequence by an investigator unaware of the genotypes. To examine the impact of the genetic background on performance on the test, we compared wildtype BDF1 mice with mice on a pure C57BL/6J background. N numbers were determined a priori with power analyses in order to limit the number of animals used to the minimum required for statistical analysis (3R principles). Male Thy1-aSyn

mice were expected to show strong deficits with low variability (see power analysis in Ref. [7]) and were therefore limited to n = 7. For the other groups larger N sizes were chosen to ensure sufficient power to detect differences (see Table 2 for N). Male and female mice of each line were tested between the age of 3 to 6 months on the pole test and the challenging beam test, and at 6 months on the adaptive rotating beam test. There was no correlation between age and performance on the pole or the beam test (spearman or pearson correlation), therefore mice of ages between 3 and 6 months were grouped together. At 6 months of age male wildtype Thy1-aSyn mice weighed 30 g and transgenics 26 g as described previously [7]. Female wildtype and transgenic Thy1-aSyn mice at 6 months of age weighed 24 g respectively and male C57Bl/6J weighed 29 g and females 25 g. The genotype was verified with polymerase chain reaction (PCR) amplification analysis of DNA [13]. Ear tissue (punch) was used for DNA extraction instead of tail biopsies to reduce stress and pain to the animal. Mice were kept on a reverse 12-h light/12h-dark cycle. All testing was performed between 1 and 5 pm during the dark cycle under low light in an allocated room for behavioral experiments outside the animal holding room. Food (Altromin standard diet) and water were available ad libitum. Mice were housed socially with littermates (1–6 mice) in makrolon cages (Type III) on standard bedding (shredded wood) and material for nest-building (paper rolls, red plastic houses) was provided. Room temperature in the mouse holding room was $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ and relative humidity was about 60%; values were recorded during the daily animal check.

2.2. Quantification of alpha-synuclein mRNA expression

Relative expression of human wildtype alpha-synuclein mRNA (SNCA) and mouse alpha-synuclein mRNA (*Snca*) was determined in male and female Thy1-aSyn mice (7–9 weeks of age) with real time qPCR as described previously [14]. Brains were rapidly removed after cervical dislocation of the mice and the substantia nigra dissected on ice. Tissue was flash frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C . RNA was extracted using the RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen). First-strand cDNA was synthesized using the PrimeScript™ RT Master Mix Perfect Real Time kit (TaKaRa clontech) and random primers according to the manufacturer's protocol. Specific TaqMan Gene expression assays were used with probes that span exons (Applied Biosystems). High efficacy of the respective assay was evaluated by the manufacturer, but specific sequences are proprietary. One microliter of cDNA was added to the Premix Ex Taq™ kit (TaKaRa clontech) for a total reaction volume of 5 µl and amplification was performed on a PikoReal 96 Real-Time PCR system (ThermoScientific) following manufacturers protocols. Data was analyzed using the PikoReal Software 2.1. (ThermoScientific). GeNorm was used to analyze candidate reference genes (*Atp5b*, *Eif4a2*, *Gapdh* and *Hprt*) according to average expression stability as described previously [15], and the normalization factor derived from the most stable genes was chosen for normalization.

2.3. Behavioral analyses

For comparisons with the novel type of rotating beam test, we used two established behavioral tests. The pole test is a test to determine motor coordination [16,17]. Mice were put head up on a vertical wooden beam with a diameter of 10 mm that was placed in the home cage. In two days of training mice learned to turn on the pole and to climb downwards. On the third day the time to turn ($t(\text{turn})$) and the time to climb down after the turn ($t(\text{descend})$) were recorded in 5 consecutive trials. If the mouse failed to turn or slid downwards, a cutoff time of 30 s ($t(\text{turn})$) or 30 s ($t(\text{descend})$) was noted. To further increase the challenge for mice with less phenotype (females), the diameter of the pole was reduced to 6 mm on

Table 1
Score system for the adaptive rotating beam test.

| parameter | classification | points |
|----------------------------|----------------|--------|
| material and diameter (mm) | wood (10) | +1 |
| | aluminum (10) | +15 |
| | aluminum (8) | +25 |
| | aluminum (6) | +50 |
| spin velocity (rpm) | 6 | +2 |
| | 10 | +4 |
| | 12 | +6 |
| | 16 | +8 |
| direction of rotation | switch halfway | +16 |
| number of falls | once | –2 |
| | twice | –4 |

the second and third day of the test in this study. Furthermore, the challenging beam test for motor coordination was performed following previously published protocols [16]: over two days, mice were trained in five consecutive trials to walk on a juvenescent plastic beam that leads to their home cage. On the third day, a mesh grid was put on top of the beam and the five runs were videotaped to analyze the number of steps and foot slips (errors) and the time needed to traverse the beam. Additionally, we recorded the number of stops on the beam, a parameter that has never been analyzed before in this test.

In order to examine if motor deficits in transgenic mice aggravate if sensorimotor integration is required a modified horizontal beam apparatus was developed. This novel type of rotating beam test allows rotation of different types of beams at controlled speed. Specifically, this test consists of different types of 1 m long round beams (material and diameter), i.e.: wood 10 mm diameter (w10), aluminum 10 mm (a10), aluminum 8 mm (a8) or aluminum 6 mm (a6) that lead to the 20 cm elevated home cage (Fig. 1A). The apparatus is composed of a switched-mode power supply (5–15 V and 0–15 A) and a control unit. A flip switch enables the clockwise and counter-clockwise rotation of the engine. A tension regulator enables controlling of the rotating speed of the beams (at 0–132 rotations/min (rpm)).

To determine the individual maximum sensorimotor performance of each mouse, the degree of difficulty to cross the beam was varied by using different rod diameters, materials and rotation speeds, each quantified using a score system (Table 1, Fig. 1B). Hereby, we adapted the difficulty of the test to the individual performance of each mouse while still keeping the conditions and the training comparable between mice. Therefore, we termed this novel procedure the adaptive rotating beam test (ARB). The detailed protocol was as follows:

Day 1:

In the first trial mice were trained to traverse the largest diameter wooden beam (w10) without rotation by following the home cage held directly in front of them until they reached the end of the beam and entered the home cage. On the second trial the mice traversed w10 towards the cage positioned at the end. In the following three trials, mice that had successfully traversed w10 were tested to traverse the beam with increasing difficulty by using an aluminum beam with decreasing diameters (a10, a8 and a6). If the mouse lost its upright body position (hanging upside down) or dropped down from the beam it was placed back on the apparatus where it fell. If this occurred more than twice it was scored as failed trial (non-performer) on the respective beam. In order to retain the positive reinforcement of reaching the cage a non-performing mouse was then not tested on further more difficult beams. In the rare occasion that a mouse could not traverse w10 in the first trial, training was continued up to 5 more trials on w10 instead of the aluminum beams.

Day 2:

On the second day, in order to ensure memory retention, we first tested if the mouse was still able to traverse the beam of maximum difficulty that it was able to traverse on day 1. If the mouse failed this trial, the next trial consisted of the beam with the next lower level of difficulty, which all mice in our study were able to traverse. In the following 4 trials the mice traversed the beam rotating at lowest velocity of 6 rpm. If the mouse failed to traverse the beam under rotation in the first trial, it was trained on a rotating beam of lower difficulty for the subsequent trials. If a mouse was not able to traverse w10 under rotation, it was trained for in total 5 trials on w10 without rotation.

Day 3:

In order to ensure memory retention, we first tested if the mouse was still able to traverse the beam of maximum difficulty under 6 rpm (or for worst performers w10 without rotation) that it was able to traverse on day 2. Again, if the mouse failed this trial, the next trial consisted of the beam with the next lower level of difficulty, which all mice in our study were able to traverse. Over the next 3 trials the speed of rotation was stepwise increased (10 rpm, 12 rpm, 16 rpm, respectively). Mice that failed a trial were not tested at higher velocities. Mice that were able to perform at 16 rpm on their respective beam type were challenged further in a consecutive trial: the direction of rotation was changed when the mouse had reached half distance of the beam while the rotation velocity was maintained.

Score system:

The individual performance of each mouse for each of the three days was recorded and scored by an investigator unaware of the genotypes cumulating in a final number of points (p) per day, with the third day integrating all parameters, type of beam, rotation velocity and ability to perform under reversal of rotation direction (Table 1). In order to determine the score according to the grade of difficulty of each beam and rotation we performed pilot experiments with wildtype mice. We observed how the animals adjusted to the respective conditions by stopping, staggering or falling of the beam. As expected the aluminum surface was more slippery compared to the wood making it more challenging for the mice to traverse. We observed that the difficulty increased strongly between the different rods, while the increase in velocity on the respective rod that the mouse was able to traverse added less to the overall difficulty. Based on these observations each particular beam and each spin velocity got a number of points (Table 1). In addition to the final score for each mouse, in order to determine where most points were acquired or lost, we also analyzed the percentage of performers for each day and each level of difficulty. This analysis provided detailed information on performance depending on beam material, diameter and rotation velocity. Further parameters that could be analyzed to evaluate motor function of the animals on the ARB test are number of steps, number of slips, time to traverse the beam, walking versus crouching on the beam.

2.4. Statistics

An analysis of variance (ANOVA) followed by a multiple comparison correcting post-hoc test (Holm–Sidak method) was used to analyze performance on the challenging beam test. The non-parametric Mann–Whitney *U* test was used to analyze the pole test and day 3 of the ARB test (SigmaPlot 12, Systat Software, Inc., San Jose, CA). Fisher exact test was used to analyze ratios of performers to non-performers on day 1 and 2 of the ARB. Behavioral testing and data analyses were performed by investigators unaware of the genotypes. The null hypothesis was rejected at $p=0.05$.

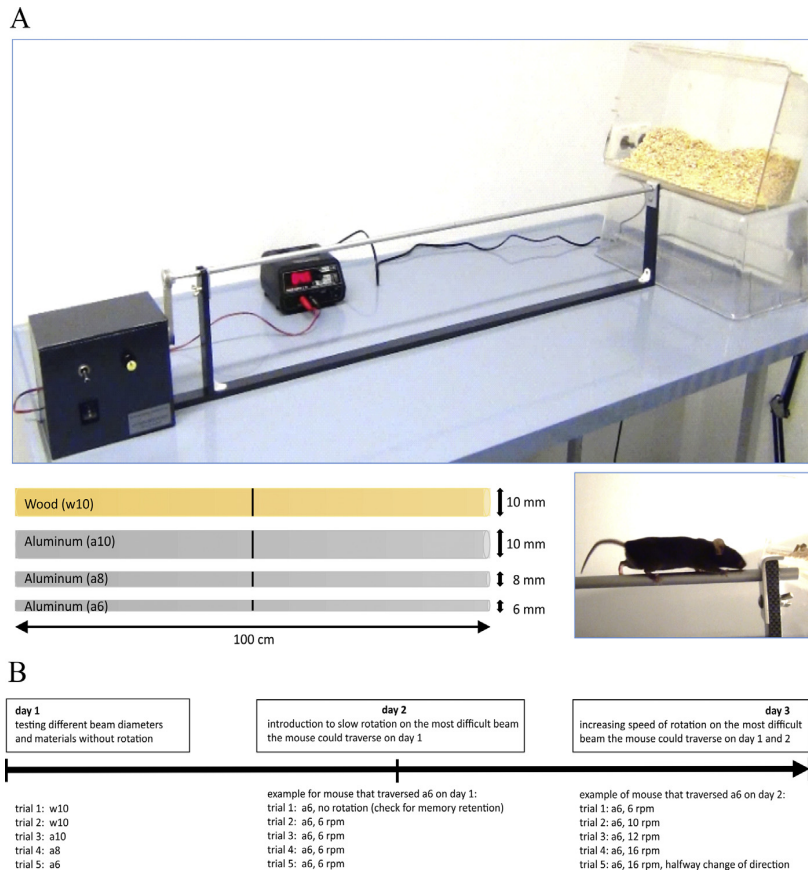


Fig. 1. The novel adaptive rotating beam (ARB) test (A) pictures and schematics, (B) time line of the protocol.

3. Results

3.1. Alpha-synuclein mRNA expression in the substantia nigra (SN)

To confirm the hypothesis that female mice show lower expression of the transgene human wildtype alpha-synuclein (*SNCA*), we first determined the relative mRNA expression of *SNCA* and mouse alpha-synuclein (*Snca*) in the SN of male and female Thy1-aSyn mice. As expected, *SNCA* was about 3 fold higher expressed in the SN compared to *snca* in male mice (Fig. 2). Female mice show lower expression of the transgene, *SNCA* was about 1.5 fold higher expressed compared to *snca* in the SN of females. There was no *SNCA* expression in wildtype mice confirming the specificity of our primers, and *snca* expression was similar across genotypes and gender (Fig. 2).

3.2. Females do not exhibit motor deficits on the pole and the challenging beam test

Next, we reproduced the previously published motor deficits of male Thy1-aSyn mice [7,16] on the pole test (Fig. 3A and B) and the challenging beam test (Fig. 3C–E). Male Thy1-aSyn mice needed more time to turn (Fig. 3A) on the pole and to descend (Fig. 3B) in comparison to their wild-type littermates ($t(\text{turn}): p=0.002$; $t(\text{descend}): p=0.006$). In the challenging beam test, male Thy1-aSyn mice made more errors per step (main effect of genotype: $F(1/49)=83.993$, $p<0.001$; Holm–Sidak method: Thy1-aSyn vs. wt: $p<0.001$; Fig. 3C) than the control group, whereby the number of steps (Fig. 3D) and the time to traverse the beam (not shown)

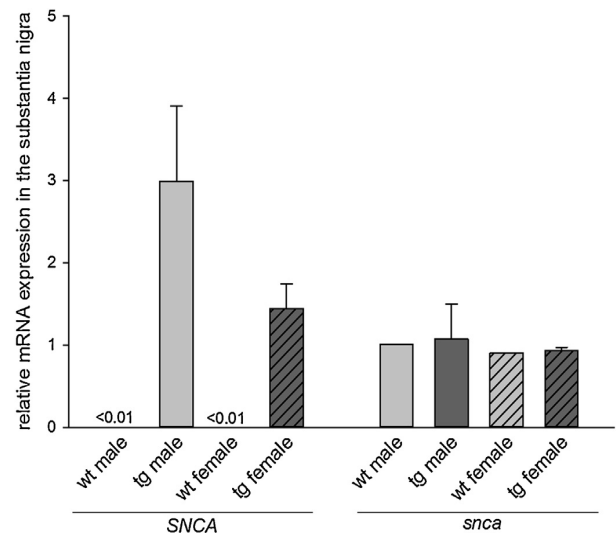


Fig. 2. Human alpha-synuclein mRNA (*SNCA*) and mouse alpha-synuclein mRNA (*snca*) expression in the SN relative to housekeeping genes (real time qPCR) (tg, transgenic Thy1-aSyn mice, $n=3$ each group, respectively; wt, wildtype BDF1 mice as negative control, $n=1$ each).

remained unaffected by the genotype. We analyzed for the first time if there is a genotype effect on the number of stops on the beam. Stops can for example represent an effort to recover optimal balance before progressing further towards the home cage. Fewer stops could potentially indicate that mice proceed more directly to

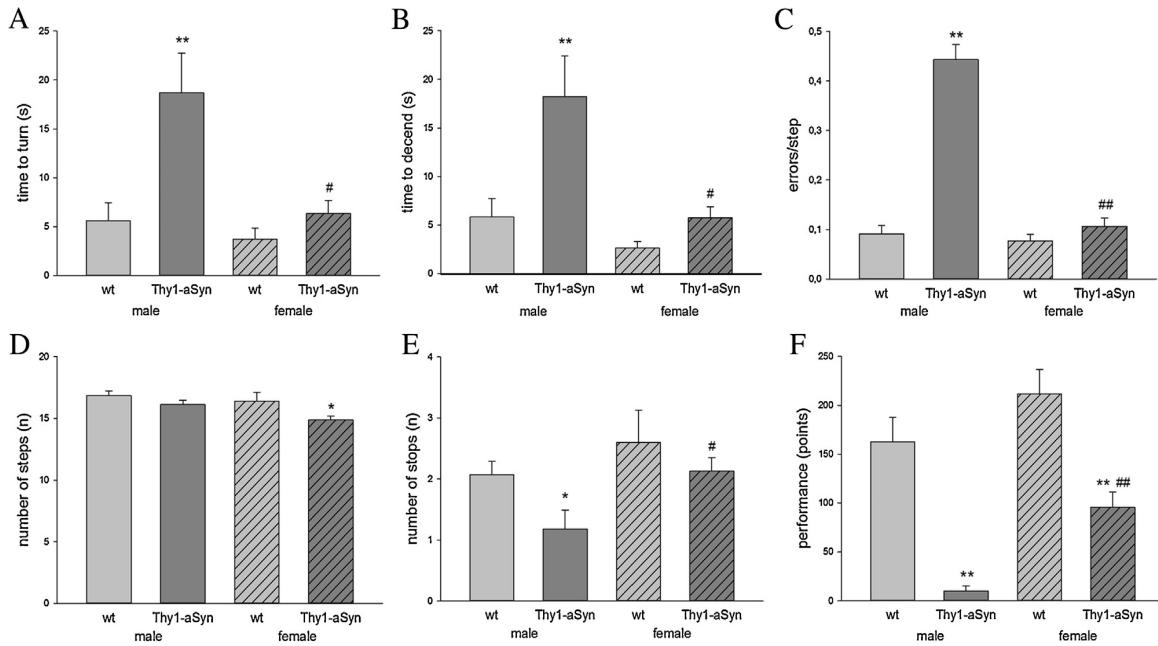


Fig. 3. Motor performance of male and female Thy1-aSyn mice and corresponding BDF1 wildtype (wt) littermates on the pole (A, B), the challenging beam (C, D, E) and the ARB (F). (A, B) Male Thy1-aSyn mice needed more time to turn and to descend on the pole compared to wt (** $p < 0.01$ rank sum test) and female Thy1-aSyn mice (# $p < 0.05$ rank sum test). (C, D, E) Male Thy1-aSyn mice made more errors/step and less numbers of steps on the challenging beam compared to wt and female Thy1-aSyn mice. Female Thy1-aSyn mice made less steps on the beam compared to corresponding wt (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared to respective wt, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ compared to males; two way ANOVA). (F) Male and female Thy1-aSyn mice obtained fewer points compared to respective wt. Male Thy1-aSyn mice performed worse compared to respective females (** $p < 0.01$ compared to respective wt, ## $p < 0.01$ compared to males; Rank Sum Test, 6 months of age). N numbers see Table 2. Bar graphs represent means + SEM.

Table 2

Performance on the adaptive rotating beam test (day 1 and 2).

| type of beam | wt (BDF1) male n = 9 | Thy1-aSyn male n = 7 | wt (BDF1) female n = 9 | Thy1-aSyn female n = 16 | wt (C57BL/6) male n = 10 | wt (C57BL/6) female n = 16 |
|------------------|----------------------------|----------------------------|------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| w10 | 100% | 86% | 100% | 100% [#] | 100% | 100% |
| a10 | 100% | 43% [*] | 100% | 88% [#] | 90% | 100% |
| a8 | 100% | 0% [*] | 100% | 75% [#] | 90% | 88% |
| a6 | 100% | 0% [*] | 78% | 44% | 30% | 38% |
| memory retention | 67% | 43% | 100% | 69% | 80% | 44% |

Percentage of mice which performed successfully on the particular beam on the first day of the ARB test and percentage of mice which could still repeat this performance on day 2 (memory retention). Age: 6 months.

^{*} $p < 0.05$ compared to respective wt.

[#] $p < 0.05$ compared to males of same genotype.

[°] $p < 0.05$ compared to BDF1 wt of same gender (fisher exact test on raw numbers).

the goal similar to what has been shown for hyperdopaminergic mice [18]. Male Thy1-aSyn mice made fewer steps on the beam (main effect of genotype: $F(1/49) = 4.948$; $p = 0.031$; Holm-Sidak method: Thy1-aSyn vs. wt: $p = 0.040$; Fig. 3E) which may be related to the increased extracellular DA levels in the transgenic mice at this young age (3–6 months).

We now aimed to study motor performance in female mice, which has previously been stated as subtle to not detectable [7], but was never analyzed rigorously. Female Thy1-aSyn mice at 3–6 months of age did not show the deficits exhibited by the male counterparts on the pole test or the beam test compared to respective female wildtype mice (no main effect of genotype, Fig. 3A–E). Female Thy1-aSyn mice needed less time to turn on the pole and to descend compared to male Thy1-aSyn mice ($t(\text{turn})$: $p = 0.019$; Fig. 3A; $t(\text{descend})$: $p = 0.021$; Fig. 3B). In the challenging beam test, female Thy1-aSyn mice made less errors/steps (main effect of sex: $F(1/49) = 70.844$, $p < 0.001$; Holm-Sidak method: male vs. female: $p < 0.001$; Fig. 3C) and more steps on the beam in comparison to male Thy1-aSyn mice (main effect of sex: $F(1/49) = 5.832$,

$p = 0.020$; Holm-Sidak method: male vs. female: $p = 0.033$; Fig. 3E). Interestingly, female mice did show trends to motor deficits and in the challenging beam test they made significant less steps on the beam in comparison to the control group (main effect of genotype: $F(1/49) = 6.295$, $p = 0.015$; Holm-Sidak method: Thy1-aSyn vs. wt: $p = 0.023$; Fig. 3D). As the increased stride length indicated by less steps does not lead to faster traversal of the beam, mice take more time for each step. This could be part of an effort to mask underlying deficits. These results support the statement that there is only a very subtle motor phenotype in female Thy1-aSyn in these tests.

3.3. Male and female mice exhibit sensorimotor deficits in the adaptive rotating beam test

Motivated by the requirement of an even more sensitive test to detect mild motor abnormalities and sensorimotor deficits in mouse models of movement disorders, we developed and constructed a new test apparatus to measure motor coordination and balance under changing sensory stimuli, the adaptive rotating

Table 3
Performance on the adaptive rotating beam test (day 3).

| type of beam | spin velocity (rpm) | wt (BDF1) male | Thy1-aSyn male | wt (BDF1) female | Thy1-aSyn female | wt (C57BL/6) male | wt (C57BL/6) female |
|--------------|---------------------|-------------------|-------------------|---------------------|---------------------|----------------------|------------------------|
| w10 | 6 | * | 86% | * | 100% | 100% | 100% |
| | 10 | * | 86% | * | 100% | 100% | 100% |
| | 12 | * | 43% | * | 100% | 100% | 100% |
| | 16 | * | 14% | * | 100% | 100% | 100% |
| a10 | 6 | * | # | * | 100% | 100% | 100% |
| | 10 | * | # | * | 100% | 100% | 75% |
| | 12 | * | # | * | 75% | 100% | 75% |
| | 16 | * | # | * | 50% | 100% | 75% |
| a8 | 6 | 100% | # | 100% | 100% | 100% | 100% |
| | 10 | 100% | # | 100% | 86% | 100% | 100% |
| | 12 | 67% | # | 100% | 71% | 100% | 90% |
| | 16 | 67% | # | 50% | 43% | 100% | 80% |
| a6 | 6 | 100% | # | 100% | 100% | 100% | 100% |
| | 10 | 100% | # | 100% | 100% | 100% | 100% |
| | 12 | 67% | # | 100% | 100% | 100% | 0% |
| | 16 | 67% | # | 100% | 67% | 33% | 0% |
| w10 | 16 with reversal | * | 14% | * | 100% | 0% | 100% |
| a10 | 16 with reversal | * | # | * | 0% | 50% | 0% |
| a8 | 16 with reversal | 33% | # | 50% | 14% | 25% | 0% |
| a6 | 16 with reversal | 17% | # | 86% | 0% | 0% | 0% |

Percentage of mice which performed successfully under specific spin velocities on the beam that they were able to traverse on day 2 and percentage of these mice that performed successfully on the last trial with change of spin direction ("reversal"). Mice were only tested with increasing rotation on the beam that they successfully traversed on day 2, therefore % performers for the 4 types of beams reflect different mice. * All of the mice performed on a beam of higher difficulty on day 1 and 2 and were therefore only tested on those beams under rotation. # None of the mice were able to perform on these beams on day 1 and 2 and were therefore only tested on w10. Age: 6 months. Due to the smaller N for each group this data was analyzed descriptively. For statistical analysis of performance on day 3 see cumulative score analysis in Figs. 3 F and 4 F.

beam (ARB) test. We first analyzed the percentage of performers for the three different test days (Tables 2 and 3) followed by statistical analyses of the scored performance on day 3 (Figs. 3 F and 4 F).

On the first day of the ARB test, we determined which beam of maximum difficulty each mouse was able to traverse (Table 2). The percentage of performers on the different beams among male Thy1-aSyn mice was lower compared to the corresponding wildtypes (e.g. 0% versus 100% on a6, for statistics see Table 2). Interestingly, this analysis suggests a deficit in female Thy1-aSyn mice compared to wildtype (e.g. 44% Thy1-aSyn performers versus 78% wildtype performers on a6). Male Thy1-aSyn mice were described to exhibit cognitive deficits at a young age prior to striatal DA loss [19]. This is supported by a lower percentage of mice able to retain the memory of motor performance from day 1 to day 2, which interestingly was most remarkable in female mice where only 69% of Thy1-aSyn mice were able to retain memory versus 100% mice of the corresponding wildtypes (Table 2).

Increasing speed of rotation further discriminated mice that were able to perform on a specific beam (Table 3): the percentage of performers decreased with increasing speed, while wildtype mice were overall more capable of adjusting to the new challenge (descriptive analysis of the % performers, Table 3). For instance, male Thy1-aSyn mice could not perform on a rotating aluminum beam which they were able to traverse without rotation, while a large subset of wildtype mice were even able to perform at the highest rotation speed. This descriptive analysis in Table 3 suggests a deficit in female Thy1-aSyn mice, which could not reach the high performance of wildtype females (all wildtype mice performed on rotating a8 or a6 beams). The genotype effect in both genders is even more obvious in the percentage of mice able to perform if the direction of rotation is reversed under highest rotation speed (Table 3, with reversal). Only 14% of male Thy1-aSyn mice could perform under this challenge and only on beam type W10, while the drop in performance in female Thy1-aSyn mice is most prominent on aluminum beams.

For quantification and statistical analysis of day 3 a score system was applied which cumulated in a final score for each mouse

and each day integrating all three parameters, type of beam, rotation velocity and ability to perform under reversal of rotation direction. Reflecting the analyses on performance described above, male Thy1-aSyn mice obtained significantly fewer points on the ARB test in contrast to their wild-type littermates ($p=0.001$; Fig. 3F). The predicted higher sensitivity of the novel ARB test was substantiated in the detection of an over 50% lower performance of female Thy1-aSyn mice compared to respective wildtype ($p=0.002$; Fig. 3F). Despite this overt motor deficit, female Thy1-aSyn mice still obtained more points on the rotating beam in comparison to the very low performing male Thy1-aSyn mice ($p<0.001$; Fig. 3F). These findings show that this new test is sensitive to replicate previously described deficits in male Thy1-aSyn mice and to unmask robust motor impairments in females of this mouse model which other tests were not able to detect.

3.4. Effects of background and gender on performance in the pole and challenging beam test

To examine if the genetic background of the mice in both genders modifies motor performance in behavioral tests, we compared male and female mice of two different strains (mixed BDF1 versus C57BL/6J background) concerning all presented motor tests. In the pole test, there was a significant interaction between gender and background: C57BL/6J females needed significantly more time to turn on the pole and to descend in comparison to females on the mixed background ($t(\text{turn})$: $p=0.029$; $t(\text{descend})$: $p=0.010$; Fig. 4A and B) and compared to C57BL/6J males ($t(\text{turn})$: $p=0.040$; $t(\text{descend})$: $p=0.020$; Fig. 4A and B). In the challenging beam test male C57BL/6J mice made significantly more errors per step in comparison to male BDF1 mice (main effect of background: $F(1/57)=19.378$, $p<0.001$; Holm-Sidak method: BDF1 vs. C57BL/6J: $p<0.001$; Fig. 4C). C57BL/6J females made significantly less errors per step on the beam compared to C57BL/6J males (main effect of sex: $F(1/57)=14.084$, $p<0.001$; Holm-Sidak method: males vs. females: $p<0.001$; Fig. 4C). There were no

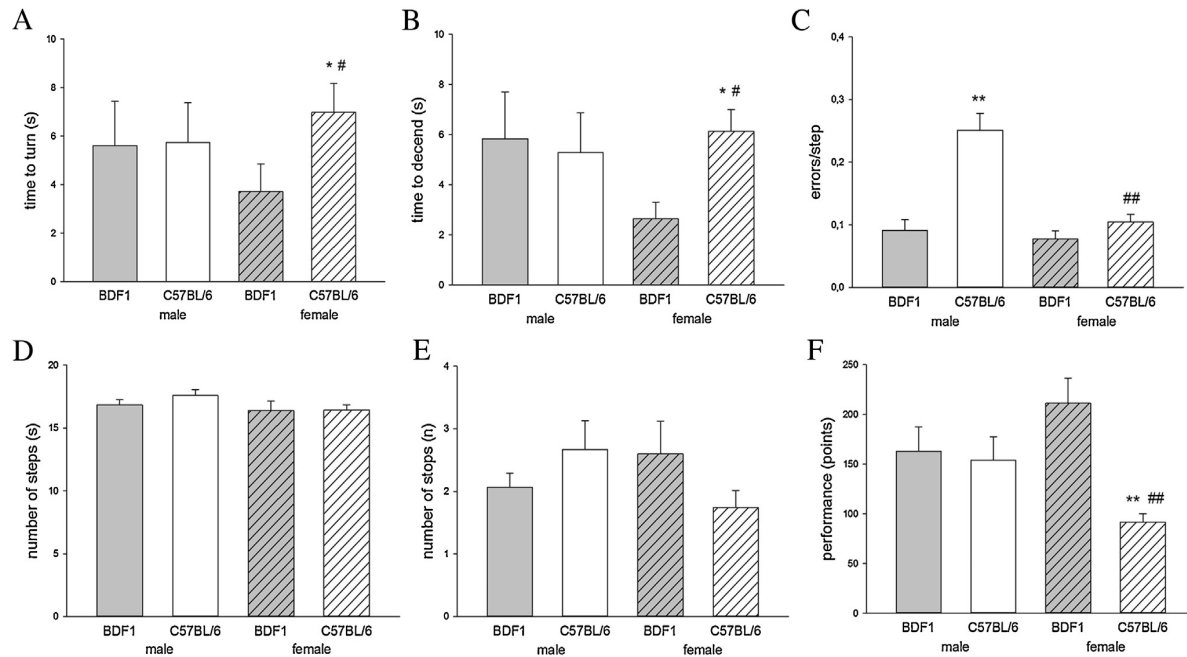


Fig. 4. Effects of gender and background on motor performance of mice on the pole (A, B), the challenging beam (C, D, E) and the ARB (F). (A, B) Female C57BL/6J mice needed more time to turn and to descend on the pole compared to female BDF1 mice (* $p < 0.05$ rank sum test) and C57BL/6J males (# $p < 0.05$ rank sum test). (C, D, E) Male C57BL/6J mice made more errors/step compared to BDF1 males (** $p < 0.01$, two way ANOVA) and female C57BL/6J mice made less errors/step compared to C57BL/6J males (## $p < 0.01$, two way ANOVA). There were no significant effects on number of steps and number of stops. (F) Females on the C57BL/6J background obtained fewer points compared to BDF1 females (** $p < 0.01$ Rank sum test) and compared to C57BL/6J males (## $p < 0.01$ Rank Sum Test); age: 6 months. N numbers see Table 2. Bar graphs represent means + SEM. For comparison purposes data of wildtype BDF1 mice shown in Fig. 3 is also presented in this figure.

significant effects of gender or background on time to traverse (not shown), number of stops and number of steps (Fig. 4D and E).

3.5. Effects of background and gender on sensorimotor performance in the adaptive rotating beam test

On the ARB test, female BDF1 mice showed a relatively high performance compared to female C57BL/6J mice (Tables 2 and 3, Fig. 4F). For instance, only 38% of C57BL/6J females traversed successfully on beam a6 on day one, compared to 78% of BDF1 females ($p = 0.097$ fisher exact test, Table 2). All BDF1 females were able to retain the memory of performance from day 1 to day 2, in contrast to only 44% of the C57BL/6J females (statistics see Table 2). Furthermore, all BDF1 females were able to perform on the most difficult beam a6 with the highest spin velocity of 16 rpm and 86% could even perform under reversal of rotation under these conditions, while none of the C57BL/6J females could traverse this type of rotating beam at 12 or 16 rpm (Table 3). Female BDF1 mice also outperformed male BDF1 mice. For example, only 67% of male BDF1 could retain the memory of performance between day 1 and 2, and only 17% were able to perform on a6 with 16 rpm and reversal (Tables 2 and 3). Contrary, in the C57BL/6J background, male mice tended to show a better performance: 80% of males were able to retain memory from day 1 to day 2 compared to only 44% of the female mice ($p = 0.1$, fisher exact test, Table 2) and on day two, for instance, no females could traverse beam a6 with a spin velocity of 12 rpm, whereas 100% of males performed successfully on this type of beam (descriptive analysis of the % performers, Table 3). There were no overt differences between male mice of both backgrounds in descriptive analysis on day 3 (Table 3). Statistical analysis of the scores agreed with the analysis of performance above: there was a significant background \times gender interaction. Females on the C57BL/6J background got significantly fewer points on day three compared to BDF1 females (Fig. 4F). C57BL/6J females

obtained significantly fewer points in comparison to males on the same background (Fig. 4F). These results support that strain and gender differences need to be taken into account when analyzing motor performance in transgenic mice.

4. Discussion

The adaptive rotating beam (ARB) test which integrates motor performance under changing sensory stimuli was sensitive to unmask motor deficits in a mouse model of PD. Therefore our results support the relevance of correct and efficient processing of sensory information for fine tuning of motor performance in PD.

PD patients show abnormalities in somatosensory perception, including alterations in processing of tactile information at an early stage of disease [20], and proprioceptive impairments (reviewed by Ref. [12]). Fine motor control impairment in PD could also be directly related to sensory dysfunction [21]. Interestingly, patients depend stronger on visual information on the position of the limb for correct movements over objects [22], suggesting deficits in integrating different sensory stimuli. It was hypothesized that in PD sensory receptive fields in the putamen send noisy feedback to the somatosensory cortex [12]. These brain areas among others are affected by alpha-synuclein accumulation and aggregation in the Thy1-aSyn mice [7] and are likely related to alterations in corticostriatal plasticity and DA homeostasis prior to the loss of DA at 14 months in this model [8–10]. The functional relevance of these alterations is shown in motor and non-motor deficits which emerge at about 2 months of age in male mice [7,16,23–25]. We here confirmed the robustness of the phenotype in 3–6 months old male Thy1-aSyn mice on the pole test and the challenging beam test, which are sensitive tests for motor deficits in mouse models of PD [16,26,27]. However, these tests are not sufficient to detect motor deficits in female Thy1-aSyn mice, as substantiated by the present data. Interestingly, female Thy1-aSyn mice do show alterations in

corticostriatal communication [8–10], supporting the existence of an endophenotype. We confirmed that the less apparent phenotype in the female mice could be the result of lower transgene expression (1.5 fold compared to 3 fold in males). In other genetic mouse models of PD this more physiological expression of the transgene was also not sufficient to create an overt motor phenotype [1,5,28,29]. These models lack the robust behavioral readout required for studying functional aspects of the pathophysiology of PD and for preclinical drug testing. A lack of motor deficits despite overt corticostriatal pathophysiology is common in rodent models of movement disorders, which may in part be due to compensatory strategies [1,11]. We hypothesized that this compensation depends highly on optimal integration of sensory information, and that fluctuating sensory input will challenge the animals and unmask motor deficits. Testing motor performance under challenging sensorimotor integration with our novel ARB test for the first time unmasked a robust deficit (50% of wildtype performance) in female Thy1-aSyn mice. Male mice reached only 10% of wildtype performance supporting a correlation of the behavioral deficit to the differences in alpha-synuclein overexpression in the SN. From the position of the mouse which is aiming for the home cage at the end of the beam the visual input is relatively stable while the proprioceptive (kinaesthesia, the conscious awareness of limb and body position, motion and orientation in space), vestibular (inner ear apparatus) and tactile (including surface and temperature) stimuli vary with introduction to different beams (wood, aluminum, diameters), rotation speeds and rotation direction. Our test may be suitable to unmask phenotypes in other animal models which have been reported to show no or very little motor deficits, especially if there is evidence for pathophysiology in the basal ganglia, such as in many genetic mouse models of dystonia [11] and PD [1]. Future studies will determine if this deficit in the ARB test is responsive to L-DOPA. In young male Thy1-aSyn mice, which show high extracellular DA, L-DOPA specifically increases the number of errors per step on the challenging beam [30]. At age of DA loss (>14 months) L-DOPA improves the impairment on the sensorimotor adhesive removal test in this model [8]. Testing L-DOPA in the ARB test in young and old mice of both genders will help to further determine the involvement of the DA system alterations in this phenotype.

How does our novel ARB test compare to other similar tests of motor behavior? A rotating beam test has previously been used for detection of anxiety in rodents [31]. Anxiety disorders share dysfunctions in multisensory integration with balance disorders [32]. This beam test is elevated more than 40 cm above the ground (compared to only 20 cm in our study) to create postural threat and increase stress-evoked sensorimotor disintegration. Mice will try to avoid falling from this height to prevent injuries and have to be motivated to cross with a food reward subsequent to a food restriction protocol. The animals are then placed on a rod (one type) under constant rotation and time to cross or body postures (e.g. flat postures is interpreted as reflecting anxiety) are analyzed [31]. Therefore, different from our ARB test, the focus is not on motor performance but on the anxiety phenotype. For comparison purposes we rerated our videos using the body posture scoring system described in these studies (angle of tail, flat position of body, slips on the beam). We found that paw slips correlated with the parameters determined in our test, while the angle at which the mouse holds the tail and the flatness of body position varied strongly between individuals inside genotypes, supporting that they reflect the different strategies mice use to perform under the challenge. We therefore conclude that in our adaptive paradigm motor performance is the major endpoint. However, we cannot exclude influence of an underlying anxiety phenotype. As anxiety can occur as non-motor symptom in PD [33], and male Thy1-aSyn mice have shown slightly increased anxiety behaviors [7], this could be a useful additional feature to measure in our test. For this pur-

pose we recommend elevation of the beam to 40 cm. In rats, a rotating pole test was performed in models of focal brain ischemia and head injury [34–36]. A disadvantage of the pole test is that performance depends largely on grip strength and differences in body weight. In our pole test paradigm (not rotating) we consistently find a negative correlation of body weight and performance independent from genotype ($p < 0.05$, spearman correlation). Another test which measures motor performance on a rotating rod is the rotarod. It measures motor coordination and balance, and was developed initially to investigate central drug effects [37]. Mice or rats are put on a rotating rod with steady or accelerating velocity and latency to fall off the rod is recorded [38]. This test is based on externally initiated and maintained movement and is therefore less suitable for analysis of sensorimotor integration deficits in PD, where abnormal processing of sensory information is thought to affect voluntary movement [12]. In our novel ARB test, mice have to voluntarily move towards the home cage, and rotation is only used to increase the challenge by introducing a changing tactile, proprioceptive and vestibular parameter.

To provide further information on performance of mice on our test we also analyzed male and female mice of two different background strains. The lack of differences between male and female BDF1 (hybrid C57Bl/6J x DBA2) mice, the background of Thy1-aSyn mice, supports that the different magnitude of motor deficits is not only the result of gender related differences. C57Bl/6J, a strain commonly used in models of movement disorders, showed overall worse performance on all tests used in this study compared to the BDF1 mice. This was unexpected as hybrid mice often represent an intermediate phenotype of the founder strains and mice on a C57Bl/6 background are often reported to be more active compared to mice on a DBA/2 background [39]. However, our observation is in agreement with one study comparing different mouse strains on motor performance, where DBA/2 outperformed C57Bl/6J [40]. This underlines that the motor tests used in our study do not merely measure motor activity, but motor performance. DBA/2 mice are also reported to show increased levels of anxiety compared to C57Bl/6J [39]. The higher performance of BDF1 mice compared to C57Bl/6J on the ARB test supports that our test measures motor performance rather than an anxiety phenotype.

In conclusion, our results provide for the first time a motor phenotype in female Thy1-aSyn mice which could now be included in studies of pathophysiology of PD or in preclinical drug testing. Furthermore, we present evidence for the importance of sensorimotor integration for compensation of motor deficits. This supports further studies on comparable test strategies for early diagnosis in patients with movement disorders. Thy1-aSyn mice represent a useful model for investigations on the pathophysiological substrate of these sensorimotor impairments.

Acknowledgements

We thank Eliezer Masliah for the Thy1-aSyn mice. We are grateful to Ulrich Gerstenberger, DVM, for building and optimizing the adaptive rotating beam apparatus. We thank Steffi Fuchs and Ina Hochheim for excellent assistance with animal husbandry and genotyping.

References

- [1] M.F. Chesselet, F. Richter, Modelling of Parkinson's disease in mice, *Lancet Neurol.* 10 (2011) 1108–1118.
- [2] M.G. Spillantini, M.L. Schmidt, V.M. Lee, J.Q. Trojanowski, R. Jakes, M. Goedert, Alpha-synuclein in Lewy bodies, *Nature* 388 (1997) 839–840.
- [3] J. Hardy, Genetic analysis of pathways to Parkinson disease, *Neuron* 68 (2010) 201–206.

- [4] N. Pankratz, W.C. Nichols, V.E. Elsaesser, M.W. Pauculo, D.K. Marek, C.A. Halter, et al., Alpha-synuclein and familial Parkinson's disease, *Mov. Disord.* 24 (2009) 1125–1131.
- [5] A. Hatami, M.F. Chesselet, Transgenic rodent models to study alpha-synuclein pathogenesis, with a focus on cognitive deficits, *Curr. Top Behav. Neurosci.* 22 (2015) 303–330.
- [6] T. Ikeuchi, A. Kakita, A. Shiga, K. Kasuga, H. Kaneko, C.F. Tan, et al., Patients homozygous and heterozygous for SNCA duplication in a family with parkinsonism and dementia, *Arch. Neurol.* 65 (2008) 514–519.
- [7] M.F. Chesselet, F. Richter, C. Zhu, I. Magen, M.B. Watson, S.R. Subramaniam, A progressive mouse model of Parkinson's disease: the Thy1-aSyn (Line 61) mice, *Neurotherapeutics* 9 (2012) 297–314.
- [8] H.A. Lam, N. Wu, I. Cely, R.L. Kelly, S. Hean, F. Richter, et al., Elevated tonic extracellular dopamine concentration and altered dopamine modulation of synaptic activity precede dopamine loss in the striatum of mice overexpressing human alpha-synuclein, *J. Neurosci. Res.* 89 (2011) 1091–1102.
- [9] N. Wu, P.R. Joshi, C. Cepeda, E. Masliah, M.S. Levine, Alpha-synuclein overexpression in mice alters synaptic communication in the corticostriatal pathway, *J. Neurosci. Res.* 88 (2010) 1764–1776.
- [10] J.B. Watson, A. Hatami, H. David, E. Masliah, K. Roberts, C.E. Evans, et al., Alterations in corticostriatal synaptic plasticity in mice overexpressing human alpha-synuclein, *Neuroscience* 159 (2009) 501–513.
- [11] F. Richter, A. Richter, Genetic animal models of dystonia: common features and diversities, *Prog. Neurobiol.* 121 (2014) 91–113.
- [12] A. Conte, N. Khan, G. Defazio, J.C. Rothwell, A. Berardelli, Pathophysiology of somatosensory abnormalities in Parkinson disease, *Nat. Rev. Neurol.* 9 (2013) 687–697.
- [13] E. Masliah, E. Rockenstein, I. Veinbergs, M. Mallory, M. Hashimoto, A. Takeda, et al., Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-synuclein mice: implications for neurodegenerative disorders, *Science* 287 (2000) 1265–1269.
- [14] F. Richter, F. Gao, V. Medvedeva, P. Lee, N. Bove, S.M. Fleming, et al., Chronic administration of cholesterol oxides in mice increases transcription of cytoprotective genes and improves transcriptome alterations induced by alpha-synuclein overexpression in nigrostriatal dopaminergic neurons, *Neurobiol. Dis.* 69 (2014) 263–275.
- [15] J. Vandesompele, K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paep, et al., Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes, *Genome Biol.* 3 (2002) (RESEARCH0034).
- [16] S.M. Fleming, J. Salcedo, P.O. Farnagut, E. Rockenstein, E. Masliah, M.S. Levine, et al., Early and progressive sensorimotor anomalies in mice overexpressing wild-type human alpha-synuclein, *J. Neurosci.* 24 (2004) 9434–9440.
- [17] K. Matsuura, H. Kabuto, H. Makino, N. Ogawa, Pole test is a useful method for evaluating the mouse movement disorder caused by striatal dopamine depletion, *J. Neurosci. Methods* 73 (1997) 45–48.
- [18] S. Pecina, B. Cagniard, K.C. Berridge, J.W. Aldridge, X. Zhuang, Hyperdopaminergic mutant mice have higher wanting but not liking for sweet rewards, *J. Neurosci.* 23 (2003) 9395–9402.
- [19] I. Magen, K.M. Cardiff, D. Dinh, K. De La Rosa, J. Kwong, E. Masliah, et al., Cognitive dysfunction and cholinergic alterations prior to DA loss in mice over-expressing wild-type human alpha-synuclein (Thy1-aSyn mice), *Neurosci. Abstr.* (2011).
- [20] H. Cao, X. Xu, Y. Zhao, D. Long, M. Zhang, Altered brain activation and connectivity in early Parkinson disease tactile perception, *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 32 (2011) 1969–1974.
- [21] M.S. Lee, C.H. Lyoo, M.J. Lee, J. Sim, H. Cho, Y.H. Choi, Impaired finger dexterity in patients with parkinson's disease correlates with discriminative cutaneous sensory dysfunction, *Mov. Disord.* 25 (2010) 2531–2535.
- [22] K.A. Martens, Q.J. Almeida, Dissociating between sensory and perceptual deficits in PD: more than simply a motor deficit, *Mov. Disord.* 27 (2012) 387–392.
- [23] I. Magen, S.M. Fleming, C. Zhu, E.C. Garcia, K.M. Cardiff, D. Dinh, et al., Cognitive deficits in a mouse model of pre-manifest Parkinson's disease, *Eur. J. Neurosci.* 35 (2012) 870–882.
- [24] S.M. Fleming, N.A. Tetreault, C.K. Mulligan, C.B. Hutson, E. Masliah, M.F. Chesselet, Olfactory deficits in mice overexpressing human wildtype alpha-synuclein, *Eur. J. Neurosci.* 28 (2008) 247–256.
- [25] L.M. Grant, F. Richter, J.E. Miller, S.A. White, C.M. Fox, C. Zhu, et al., Vocalization deficits in mice over-expressing alpha-synuclein, a model of pre-manifest Parkinson's disease, *Behav. Neurosci.* 128 (2014) 110–121.
- [26] X.H. Lu, S.M. Fleming, B. Meurers, L.C. Ackerson, F. Mortazavi, V. Lo, et al., Bacterial artificial chromosome transgenic mice expressing a truncated mutant parkin exhibit age-dependent hypokinetic motor deficits, dopaminergic neuron degeneration, and accumulation of proteinase K-resistant alpha-synuclein, *J. Neurosci.* 29 (2009) 1962–1976.
- [27] D.Y. Hwang, S.M. Fleming, P. Ardayfio, T. Moran-Gates, H. Kim, F.I. Tarazi, et al., 3,4-Dihydroxyphenylalanine reverses the motor deficits in Pitx3-deficient aphakia mice: behavioral characterization of a novel genetic model of Parkinson's disease, *J. Neurosci.* 25 (2005) 2132–2137.
- [28] Y.M. Kuo, Z. Li, Y. Jiao, N. Gaborit, A.K. Pani, B.M. Orrison, et al., Extensive enteric nervous system abnormalities in mice transgenic for artificial chromosomes containing Parkinson disease-associated alpha-synuclein gene mutations precede central nervous system changes, *Hum. Mol. Genet.* 19 (2010) 1633–1650.
- [29] T.N. Taylor, D. Potgieter, S. Anwar, S.L. Senior, S. Janezic, S. Threlfell, et al., Region-specific deficits in dopamine, but not norepinephrine, signaling in a novel A30P alpha-synuclein BAC transgenic mouse, *Neurobiol. Dis.* 62 (2014) 193–207.
- [30] S.M. Fleming, J. Salcedo, C.B. Hutson, E. Rockenstein, E. Masliah, M.S. Levine, et al., Behavioral effects of dopaminergic agonists in transgenic mice overexpressing human wildtype alpha-synuclein, *Neuroscience* 142 (2006) 1245–1253.
- [31] E.M. Lepicard, P. Venault, J. Negroni, F. Perez-Diaz, C. Joubert, M. Nosten-Bertrand, et al., Posture and balance responses to a sensory challenge are related to anxiety in mice, *Psychiatry Res.* 118 (2003) 273–284.
- [32] C.D. Balaban, Neural substrates linking balance control and anxiety, *Physiol. Behav.* 77 (2002) 469–475.
- [33] I.H. Richard, Anxiety disorders in Parkinson's disease, *Adv. Neurol.* 96 (2005) 42–55.
- [34] A.L. Ohlsson, B.B. Johansson, Environment influences functional outcome of cerebral infarction in rats, *Stroke* 26 (1995) 644–649.
- [35] B.B. Johansson, A.L. Ohlsson, Environment, social interaction, and physical activity as determinants of functional outcome after cerebral infarction in the rat, *Exp. Neurol.* 139 (1996) 322–327.
- [36] G.J. Mattiasson, M.F. Philips, G. Tomasevic, B.B. Johansson, T. Wieloch, T.K. McIntosh, The rotating pole test: evaluation of its effectiveness in assessing functional motor deficits following experimental head injury in the rat, *J. Neurosci. Methods* 95 (2000) 75–82.
- [37] N.W. Dunham, T.S. Miya, A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice, *J. Am. Pharm. Assoc.* 46 (1957) 208–209.
- [38] B.J. Jones, D.J. Roberts, The quantitative measurement of motor inco-ordination in naive mice using an accelerating rotarod, *J. Pharm. Pharm.* 20 (1968) 302–304.
- [39] J.N. Crawley, J.K. Belknap, A. Collins, J.C. Crabbe, W. Frankel, N. Henderson, et al., Behavioral phenotypes of inbred mouse strains: implications and recommendations for molecular studies, *Psychopharmacology (Berl.)* 132 (1997) 107–124.
- [40] G.W. Bothe, V.J. Bolivar, M.J. Vedder, J.G. Geistfeld, Behavioral differences among fourteen inbred mouse strains commonly used as disease models, *Comp. Med.* 55 (2005) 326–334.

4 Publikation 2

Richter F, Gerstenberger J, Bauer A, Liang CC, Richter A. Sensorimotor tests unmask a phenotype in the DYT1 knock-in mouse model of dystonia. Behavioural Brain Research. 2016;317:536-41

Sensomotorische Verhaltenstests enthüllen einen Phänotyp im DYT1 Knock-in Mausmodell für die Dystonie

Eigenanteil der Publikation:

Folgende Aufgaben und Untersuchungen, die Bestandteil der nachfolgenden Publikation sind, wurden von mir persönlich durchgeführt:

- Zucht, Pflege und Genotypisierung der Versuchstiere
- Erstellung und Organisation der Versuchspläne
- Etablierung der Verhaltenstests am Institut
- Durchführung und statistische Auswertung aller Verhaltensversuche
- Verfassen von Teilen des Manuskripts der Publikation (insbesondere die Abschnitte Material, Methoden und Ergebnisse)

Das Projekt wurde von Prof. A. Richter und Frau Dr. F. Richter geleitet und betreut. Von A. Bauer wurde ich bei der Zucht, Pflege und Genotypisierung der Tiere unterstützt, gleichzeitig übernahm sie, wie auch Frau Dr. F. Richter, in einigen Versuchen assistierende Aufgaben. Weiterhin wirkte Frau Dr. Richter bei der statistischen Auswertung der Experimente mit. Die Erstellung und Korrektur des Manuskripts erfolgte außerdem durch Prof. A. Richter und Dr. F. Richter. Dr. C. Liang war an der Generierung der DYT1 KI Mäuse beteiligt, stellte Zuchtpaare für diese Arbeit zur Verfügung und brachte Verbesserungsvorschläge zum Manuskript ein.

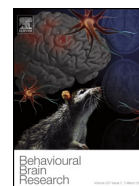
Tierversuche:

Die durchgeführten tierexperimentellen Versuche wurden von der Landesdirektion Sachsen (Dienststelle Leipzig: Braustraße 2, 04107 Leipzig) in dem Antrag auf Genehmigung eines Versuchsvorhabens gemäß § 8 Tierschutzgesetz unter der Registriernummer TVV 20/13 mit dem Titel „Untersuchungen an Mausmodellen für Bewegungsstörungen: Phänotypisierung und Entwicklung neuer Therapieansätze“ am 26.07.2013 genehmigt.



Contents lists available at ScienceDirect

Behavioural Brain Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbr

Research report

Sensorimotor tests unmask a phenotype in the DYT1 knock-in mouse model of dystonia



Franziska Richter (DVM, PhD)^{a,*}, Julia Gerstenberger (DVM)^{a,1}, Anne Bauer (DVM)^a, Chun-Chi Liang (PhD)^b, Angelika Richter (DVM, PhD)^{a,*}

^a Institute of Pharmacology, Pharmacy and Toxicology, Department of Veterinary Medicine, Leipzig University, An den Tierkliniken 15, 04103, Leipzig, Germany

^b Department of Neurology and Department of Cell and Developmental Biology, University of Michigan Medical School, Ann Arbor, MI, USA

HIGHLIGHTS

- We established a behavioural readout for neuronal dysfunction in DYT1 KI mice.
- DYT1 KI mice exhibited sensorimotor deficits in the adhesive removal test.
- Deficits were detected in a complex rotating beam test with changing sensory input.
- Deficits may reflect previously shown cerebellothalamocortical tract alterations.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 September 2016

Received in revised form 13 October 2016

Accepted 17 October 2016

Available online 18 October 2016

Keywords:

Torsion dystonia

Genetic model

Sensorimotor impairments

Endophenotype

ABSTRACT

Hereditary generalized dystonia is often caused by a GAG deletion in *TOR1A* (*DYT1*) that encodes for the protein torsinA. Although mutation carriers show alterations in neuronal connectivity and sensorimotor deficits, only 30% develop dystonia. Uncovering the factors triggering the dystonic symptoms and underlying pathophysiology would greatly benefit the development of more effective therapies. In DYT1 knock-in (KI) mice, the expression of torsinA mutant alters the connectivity of neurons and the function of striatal cholinergic interneurons. We aimed to determine if heterozygous DYT1 KI mice exhibit deficits in behavioural tests that explore the connectivity of the sensory and motor system. DYT1 KI mice were tested in cognitive tests and challenging motor paradigms, followed by the adhesive removal test and the adaptive rotating beam test which both require sensorimotor integration. DYT1 KI mice did not exhibit cognitive deficits and were able to perform similarly to wild type mice even in challenging motor tests with relatively stable sensory input. Conversely, DYT1 KI mice spent more time on sensing and removing an adhesive sticker from the back of the nose; they exhibited difficulty to traverse rotating rods, especially if the surface was smooth and the diameter small. Our observations further support a role of sensorimotor integration in manifestation of this movement disorder. Future studies in DYT1 KI mice will explore the involved neurocircuitry and underlying molecular mechanisms.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

Abbreviations: DYT1 KI, knock in mouse model of DYT1 dystonia; ARB, adaptive rotating beam.

* Corresponding authors.

E-mail addresses: franziska.richter@vmf.uni-leipzig.de (F. Richter),

julia.gerstenberger@vetmed.uni-leipzig.de (J. Gerstenberger),

anne.bauer@vetmed.uni-leipzig.de (A. Bauer), chunchi@med.umich.edu

(C.-C. Liang), angelika.richter@vetmed.uni-leipzig.de (A. Richter).

¹ These authors contributed equally to this work.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2016.10.028>

0166-4328/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Dystonia is a movement disorder characterized by sustained or intermittent muscle contractions, often initiated or worsened by voluntary action. For the inherited forms, a growing number of genes have been assigned a DYT designation [1]. DYT1 torsion dystonia is caused by a GAG deletion in *TOR1A*, which encodes for the chaperone like protein torsinA. However, only about 30% of the mutation carriers develop clinically overt dystonia, whereby the contributing factors to this reduced penetrance are poorly understood [2]. Sensory abnormalities and specifically deficits in sensorimotor integration are increasingly recognized in patients

[3]. DYT1 mutation carriers are deficient in the temporal discrimination of sensory stimuli independent of clinical manifestation [4]. As deficits in generalized dystonia were observed for different sensory stimuli, it was hypothesized that basal ganglia dysfunction results in incorrect integration of sensory information [5]. Recently, functional brain imaging studies have suggested abnormal integration of sensory input with sensorimotor network activity as a trait feature of the disease [6]. This was corroborated by magnetic resonance diffusion tensor imaging studies which found alterations in cerebellothalamocortical connectivity in DYT1 dystonia [7,8]. These changes were hypothesized to regulate the disease penetrance [7]. Importantly, these circuit abnormalities are not limited to primary sensorimotor pathways, but also include motion perception pathways, which are disrupted in DYT1 dystonia [9].

Studies in animal models of DYT1 dystonia are invaluable to understand the mechanisms by which mutation in TorsinA disrupts neuronal connectivity [10–12]. Previous studies have provided strong evidence that mutated *Tor1a* is a loss of function allele and homozygous *Tor1a* mutants or knockout mice die shortly after birth [13]. Importantly conditional *Tor1a* mutants in which the entire CNS either lacks torsinA or expresses pathogenic mutated *Tor1a* exclusively, showed overt dystonic-like twisting movements and histopathological changes specific to sensorimotor structures [14]. The knock-in (KI) mouse model of DYT1 dystonia (DYT1 KI) which carries GAG deletion mutation in *Tor1a* [13] is closest to the human disease in terms of construct validity [10]. Importantly, DYT1 KI mice exhibited cerebellothalamocortical tract changes highly similar to those identified by imaging studies in human nonmanifesting gene carriers [15]. These changes correlated to metabolic activity in the sensorimotor cortex of DYT1 KI mice [15]. The involvement of basal ganglia and cerebellar dysfunction in these mice is further supported by subtle microstructural and neurochemical alterations [16,17], as well as by selective alterations of corticostriatal synaptic plasticity [18]. However, as these mice do not develop an overt motor phenotype, they were suggested to reflect non-dystonic mutation carriers [10].

Based on the evidence of alterations in the neuronal connectivity of DYT1 KI CNS, we hypothesized that DYT1 KI mice show behavioural deficits when the sensorimotor integration and motion perception are challenged. For testing this hypothesis, we chose the adhesive removal test to examine sensorimotor integration and the adaptive rotating beam to test integration of different sensory information, including motion perception [19].

2. Material and methods

2.1. Animals

Animal husbandry was in compliance with the German Animal Welfare Agency and experimental procedures were authorized under protocol number TVV20/13. Naïve young adult (14–24 weeks old) male heterozygous DYT1 (Δ GAG) knock-in mice (DYT1 KI, $n = 11$) on a C57BL/6J background and wild type littermates ($n = 12$) were used in this study. They were bred and housed in the institute's facility in groups up to 6 littermates. Behavioural testing was carried out between 1 and 5 pm and mice were kept on a reversed 12-h light/12h-dark cycle. Food and water were supplied ad libitum. To verify the genotype, we used polymerase chain reaction (PCR) amplification analysis of DNA extracted from ear tissue. PCR was carried out with PuReTaq Ready-To-Go PCR Beads (GE Healthcare) as described previously [13]. DYT1 KI mice samples show a double band at 300 bp and 340 bp by agarose gel electrophoresis (Fig. 1A).

2.2. Cognitive and motor behavioural tests

For in depth phenotyping of the DYT1 KI mouse model, a sequence of cognitive, motor and sensorimotor behavioural tests were performed as presented in Fig. 2. Mice were first tested for cognitive function and general activity, followed by tests for motor ability and sensorimotor integration. Specifically the Y maze was performed to assess cognitive function [20]. Mice were put in a Y-shaped apparatus (arms: 5 cm wide \times 25 cm long) and the visit of the three arms were recorded over 7 min. Then, the spontaneous alternation was determined using the following formula: $\text{spontaneous alternation} = (\text{total alternation} / \text{total entries} - 2) \times 100$. One alternation occurred when the mouse visited every single arm in succession without repetition during three entries. The open field (45 cm \times 45 cm) test was used to record general activity and exploration of mice over 15 min [21]. Parameters analyzed included velocity, distance moved, time spent in corners and borders, time spent in center, moving and not moving (EthoVision XT 10, Noldus). For detection of more subtle motor deficits, we then performed the challenging beam test as described previously [19]. Briefly, the performance was measured on a beam with a mesh grid overlaid to evaluate the errors per step (slips through the grid). Furthermore, the time needed to traverse the beam, the number of stops and the number of steps were recorded. For measuring grip strength combined with balance, the vertical pole test was performed as described previously [19]. After 2 days of training, the time to turn and the time to climb downwards after the turn (time to descend) over 5 trials were recorded (cutoff time 30 s for turn or descend, respectively). For climbing activity, shown to differ in animal models of movement disorders [22], we videotaped the activity of mice in a mesh wire cylinder (13 cm \times 16 cm) over 5 min. Afterwards, time was recorded for the measurement of climbing, rearing, grooming and inactivity (no moving or sniffing). Mice may show higher performance under observation outside the homecage. Therefore, we used the nest building test to quantify fine motor skills inside the homecage and holding room [23]. Mice were housed separately for 12 h in a standard cage with absorbent cotton nesting material (1 g) placed on top of each wire cover. The amount of material not pulled into the cage to be used for nest building was weighed after 3, 6 and 12 h. To evaluate catalepsy, mice were put with their forepaws on a 5 cm high cube and the latency to remove the paws or to jump on top of the cube were measured over 3 trials in the block test with a cut off set at 60 s [21].

2.3. Adhesive removal test and adaptive rotating beam (ARB) test

We chose two tests which rely heavily on sensory input and feedback during motor performance in order to challenge sensorimotor integration. Mice were first tested in the adhesive removal test [23,24]. In this test, a round sticker (1 cm diameter) was put on the bridge of the nose and the animal was immediately returned to a cage with bedding material but devoid of littermates or environmental enrichment to reduce variability due to potential distraction. The latency to touch the sticker and the latency to remove the sticker were recorded in 3 consecutive trials with a cut off time of 120 s. If mice immediately touch the sticker but have difficulty removing it, then this indicates dysfunctions of fine motor control rather than sensing. A delay in touching the sticker, with or without immediate removal, suggests impairments of the sensory system or sensorimotor signaling pathways.

The adaptive rotating beam (ARB) test was performed as final behavioural test (Fig. 2) on a randomly selected subset of the animals sufficient for high statistical power to detect differences ($n = 8$ wildtype, $n = 6$ DYT1 KI) to quantify motor ability requiring the integration of different sensory information including motion perception with movement, as described recently [19]. Briefly, the

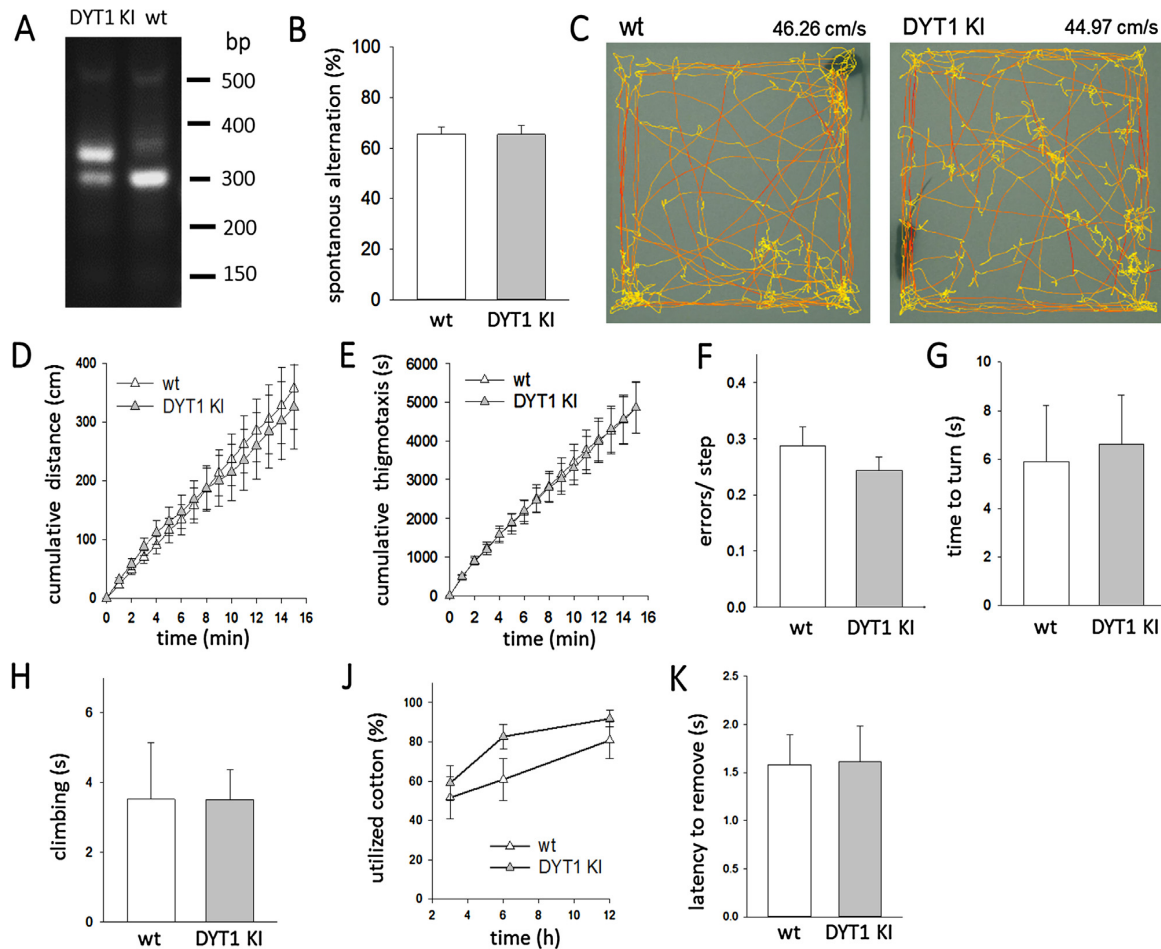


Fig. 1. (A) PCR products from DYT1 KI mice (300 bp and 340 bp), and wild type mice (wt, 300 bp) by agarose gel electrophoresis. (B) Y maze test; (C-E) open field test (track plots with red color depicting higher velocity (cm/s), distance moved and thigmotaxis); (F) challenging beam test; (G) pole test; (H) cylinder test; (I) nest building test; (J) block test; n (wt) = 12, n (DYT1 KI) = 11. Data is presented as means \pm SEM. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

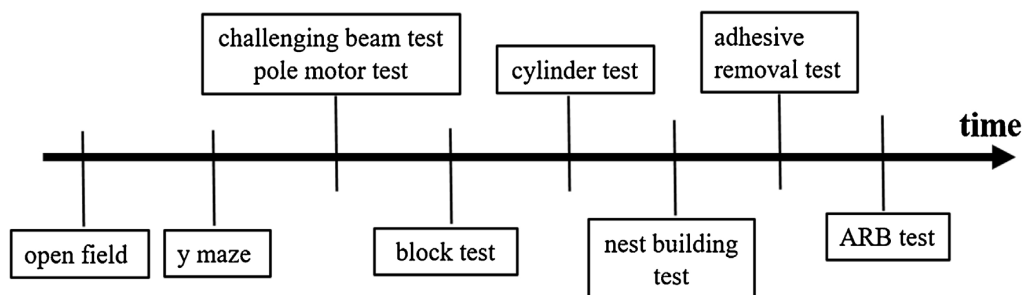


Fig. 2. Sequence of behavioural tests performed in this study. Tests most sensitive to handling and stress (cognitive test, open field) were performed first followed by the remaining motor and sensorimotor tests. Per day only one behavioural test was performed, except for the challenging beam and the pole test which were done at the same day.

test is composed of horizontal rotatable beams of various materials (wood and aluminum) and diameters (10 mm, 8 mm, 6 mm) that lead to the home cage of the mice. In a three-day test session, the individual abilities of the mice were quantified by determining the respective type of beam mice were able to traverse successfully in 5 consecutive trials on day one. In the first trial on day two of the ARB test, it was analyzed whether mice were able to repeat their successful performance on the most difficult beam they could traverse on day one to evaluate memory retention. Subsequently,

they were adapted to a fixed spin velocity (6 rpm) in the following four trials. On the third day, spin velocity was increased over 4 trials (from 6 to 10, 12 and 16 r/min). If mice were able to perform successfully under highest velocity in trial 4, the direction of rotation was changed in the fifth trial. For analyses of the performance determined on day three, we used a score system. As described previously [19] this score reflects the maximum individual performance of each mouse. The assignment of points is related to the grade of difficulty of each beam and rotation which was deter-

mined in pilot experiments with wild type mice [19]. For example we had observed that the difficulty increased strongly between the different rods, while the increase in velocity on the respective rod that the mouse was able to traverse added less to the overall difficulty. The score system that was composed of points depending on the different parameters of the test (material and diameter of the beam, spin velocity, direction of the rotation and success of the run) reflected the cumulative individual performance of the mice [19].

2.4. Statistical analysis

All results of behavioural testing were acquired and analyzed by an investigator who was blind to the genotypes. Statistics were analyzed with SigmaPlot 12.5 (Systat Software, Inc., San Jose, CA). A priori power analysis supported that N of 11–12 mice as used for all behavioural testing except the ARB test was sufficient to detect at least a 50% deficit with 80% power. Power analysis of the acquired data supported a priori results, for example for the open field (distance moved, 80% power to detect a 30% deficit), the challenging beam (errors per step, 80% power to detect a 50% deficit) and the nest building test (90% power to detect a 30% deficit). The low variability in the ARB test provided higher power to detect deficits ($n=6-8$ was sufficient to detect a 50% deficit with 90% power). Analysis of variance (ANOVA) was used prior to a multiple comparison correcting post-hoc test (Holm-Sidak method) for multifactorial data (repeated measurements across genotypes). Rank sum test was performed to analyze non-parametric data in the adhesive removal test, day three of the ARB test, the Y maze, the vertical pole test and the block test. The parameters of the cylinder test were analyzed with student's *t*-test. Significance was assigned at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. DYT1 KI mice exhibit no overt cognitive impairments or motor deficits in challenging tests

To rule out that DYT1 KI mice exhibit overt cognitive deficits we first tested these mice in the Y maze test. The percentage of spontaneous alternations was similar in DYT1 KI mice and wild type littermates (Fig. 1B). Next mice were placed in an open field and an extensive set of parameters was recorded in order to provide an exhaustive overview of general activity. There were no significant differences between DYT1 KI and wild type cohorts in any of the evaluated parameters (track plots, distance and velocity, thigmotaxis in Fig. 1C–E). The following tests were chosen for careful examination of fine motor control and postural stability. First, in the challenging beam test, the performance of DYT1 KI and wild type mice did not differ with regard to errors/step (Fig. 1F), the time to traverse and the number of steps or stops (not shown). DYT1 KI mice were as fast as wild type mice to turn head down on a wooden pole, a challenge that requires motor coordination and sufficient grip strength (Fig. 1G). Climbing activity is a sensitive measure for motor deficits in animal models of movement disorders [22] but was unchanged in DYT1 KI mice compared to wild type mice (Fig. 1H). DYT1 KI mice exhibited the same nest building activity in the home cage as their wild type littermates, demonstrating a lack of overt motor deficits without direct interference of the investigator (Fig. 1J). Lastly we confirmed the absence of a cataleptic phenotype in these mice by measuring the time to remove the front paws set on wooden block. DYT1 KI climbed off the block as fast as their corresponding wild type littermates (Fig. 1J). In summary these results support that DYT1 KI mice do not exhibit motor deficits even in a battery of highly sensitive tests.

3.2. DYT1 KI mice exhibit motor deficits in tests that require high level of sensorimotor integration

In order to test our hypothesis that DYT1 KI mice show behavioural deficits when the sensorimotor integration and motion perception are particularly challenged, we next performed the adhesive removal and the novel ARB test. DYT1 KI mice required more than double as much time to touch and to remove the sticker placed on the nose compared to controls over a mean of 3 trials (2.7 fold increase, $p=0.029$, rank sum test, Fig. 3A). Importantly, variability decreased from the first to the third trial such that the deficit in the third trial was even more robust (3.5 fold increase, $p < 0.001$, rank sum test, Fig. 3B). The delay in touching the sticker was followed by immediate removal (time to remove = time to touch) which reflects alterations of sensorimotor integration rather than fine motor impairments only. Next the novel ARB test was performed. This test requires the integration of different sensory information, including motion perception, with movement. During the first day of the test we determined the most difficult type of beam that each mouse was able to traverse. Interestingly, all eight wild type mice were able to traverse beams w10 to a8 successfully, compared to only two-thirds of DYT1 KI mice (for a10 and a8). For a6, none of the mutant mice was able to traverse this most challenging beam on day 1 of the test, compared to 38% of wild type mice. Analysis of memory retention did not reveal differences between the genotypes: 87% of wild type mice and 83% of mutant mice could still repeat their performance of the previous day. On the second day of the ARB test, which serves to further train mice on the respective beam they are able to traverse with slow rotation, both genotypes performed similarly. On day three of the test, we added further sensory stimuli by rotating the beam at different speeds and switch of rotation direction. This was done using only the type of beam that the mouse was able to traverse on day 2 which allows measurement of the optimal individual performance for each mouse. In order to quantify this performance the mice were assigned performance points depending on the type of beam, the rotation speed with or without reversal and the number of errors they made [19]. DYT1 KI mice received a significantly lower score for performance compared to wild type mice (2.2 fold deficit, $p=0.001$, rank sum test, Fig. 3C).

4. Discussion

Here we present for the first time that DYT1 KI mice exhibit deficits when their sensorimotor integration function is challenged. Our data provide a behavioural paradigm showing echoes of the previously described subtle neuroanatomical and metabolic impairments in these mice. While all behaviour requires some degree of sensorimotor integration we have taken special care to minimize fluctuations in sensory stimuli during the motor and cognitive behavioural tests, in order to focus the determination on motor or cognitive ability. Our results are consistent with previous work showing that in this line of DYT1 KI mice expression of phenotype is modulated by the genetic background, whereby mice on the C57BL/6J background used here did not exhibit a motor phenotype [25]. This observation and the subtle motor phenotype likely produced by abnormal muscle contractions in another line of DYT1 KI mice [26,27] support the influence of genetic modifiers on penetrance in DYT1 dystonia [2].

Previous studies on sensory or sensorimotor deficits are very limited in animal models of dystonia [10,28]. While we minimized sensory impact in the motor and cognitive tests, we now employed two tests with a strong and reproducible sensory component. Our results recommend the adhesive removal test, which is suitable to detect impairments of somatosensory and motor abilities [23],

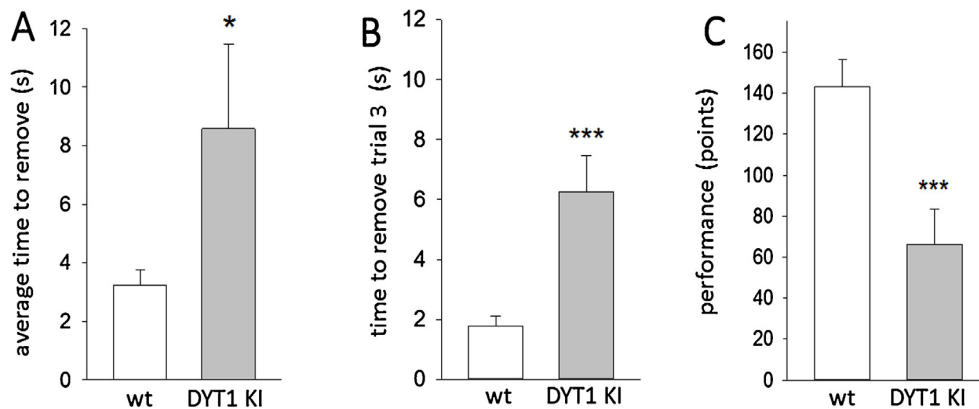


Fig. 3. (A) DYT1 KI mice required more than double as much time to remove the sticker placed on the nose compared to wild type (wt) controls over a mean of 3 trials (2.7 fold increase, * $p=0.029$, rank sum test). (B) Variability decreased from the first to the third trial such that the deficit in the third trial was even more robust (3.5 fold increase, *** $p<0.001$, rank sum test); n (wt)=12, n (DYT1 KI)=11. (C) DYT1 KI mice attained a significantly lower score for the performance on the ARB compared to wt (2.2 fold deficit, $p=0.001$, rank sum test); n (wt)=8, n (DYT1 KI)=6. Data is presented as means + SEM.

for phenotyping dystonia models. Mice have to first detect the presence of the sticker in order to initiate movement for removal, making this test rely heavily on sensorimotor integration. DYT1 KI mice required more time to touch and remove the sticker, and this deficit was consistent over three consecutive trials. Somatosensory and sensorimotor deficits are increasingly recognized across different types of dystonia and may, in some cases, unmask an endophenotype [4]. Our observations point to a role of *torsinA* in the function of sensorimotor circuit structures [14].

Impairments in the novel ARB test further substantiate the presence of a behavioural deficit in DYT1 KI mice. The complete absence of deficits on the very sensitive motor tests employed in this study argues against a pure motor deficit in DYT1 KI mice. The challenging beam test and the nest building test, for example, required a high degree of fine motor control and provide sufficient statistical power to detect subtle impairments in animal models of movement disorders which cannot be detected in standard behavioural tests [23]. Compared to the challenging beam test, where the conditions are kept constant during traversal, the ARB test requires the mice to constantly readjust to new types of beams, speed of rotation or rotation direction, thereby challenging sensorimotor integration [19]. Mutants exhibited worse motor performance when first presented with the new size of beams. However, they were able to traverse the familiar beam at constant low rotation on the subsequent day, supporting that the deficit is not only related to the task of crossing the round beam. The deficit reappears when the speed of rotation was increased or the rotation direction was changed, as quantified in a lower total performance score. This indicates a deficit in sensorimotor integration and in switching from a previously learned task to a new challenge. This observation supports the hypothesis that in DYT1 KI mice, and dystonia patients, adaptation of motor performance is altered by aberrantly increased synaptic plasticity [18].

Cerebellothalamocortical tract changes identified by imaging studies in DYT1 KI mice and human DYT1 gene carriers may be involved in the observed sensorimotor deficits, especially as these changes correlated to metabolic activity in the sensorimotor cortex of DYT1 KI mice [15]. Subtle alterations in interneuron size, synaptic spine densities and extracellular dopamine levels in the striatum [16,29] and subtle structural changes of dendrites and dendritic spines of cerebellar Purkinje cells [17] likely contribute to the phenotype. Importantly, homozygous *torsinA* loss-of-function during a neurodevelopmental window is sufficient to induce overt abnormal motor behaviour and neurodegeneration, further supporting the integral role of this protein for neuronal function [14,30]. While

the link between these pathological alterations and the observed behavioural deficits is compelling, further studies are warranted to establish dysfunctions in sensorimotor integration in this mouse model. These investigations will aim to uncover the underlying alterations in neuronal circuitry and molecular pathways altered by *torsinA* mutation.

In summary, our results suggest that motor impairments in DYT1 KI animals only exhibit when the sensory stimuli are strongly altered during performance. If DYT1 induced pathophysiology is present in this model, as indicated by the observed behavioural deficits, these mice could be uniquely suited to study factors that drive the development of overt dystonia. Modifying specific neuronal circuits while recording the behavioural phenotype in these mice could enhance our understanding of the anatomical substrate and pathophysiology of these impairments in the DYT1 KI mouse model.

Acknowledgements

This work was partly funded by the Dystonia Medical Research Foundation (FR, AR) and by an excellence student stipend of the University of Leipzig (AB). We thank William T. Dauer for providing us with the DYT1 KI mice and Steffi Fuchs for excellent technical assistance.

References

- [1] K. Lohmann, C. Klein, Genetics of dystonia: what's known? What's new? What's next? *Mov. Disord.* 28 (2013) 899–905.
- [2] D. Martino, A. Gajos, V. Gallo, L. Cif, P. Coubes, M. Tinazzi, et al., Extragenetic factors and clinical penetrance of DYT1 dystonia: an exploratory study, *J. Neurol.* 260 (2013) 1081–1086.
- [3] A. Quartarone, M. Hallett, Emerging concepts in the physiological basis of dystonia, *Mov. Disord.* 28 (2013) 958–967.
- [4] M. Fiorio, M. Garbarin, E.M. Valente, P. Liberini, M. Loi, G. Cossu, et al., Defective temporal processing of sensory stimuli in DYT1 mutation carriers: a new endophenotype of dystonia? *Brain* 130 (2007) 134–142.
- [5] M. Tinazzi, T. Rosso, A. Fiaschi, Role of the somatosensory system in primary dystonia, *Mov. Disord.* 18 (2003) 605–622.
- [6] M. Carbon, M. Argyelan, C. Habeck, M.F. Ghilardi, T. Fitzpatrick, V. Dhawan, et al., Increased sensorimotor network activity in DYT1 dystonia: a functional imaging study, *Brain* 133 (2010) 690–700.
- [7] M. Argyelan, M. Carbon, M. Niethammer, A.M. Ulug, H.U. Voss, S.B. Bressman, et al., Cerebellothalamocortical connectivity regulates penetrance in dystonia, *J. Neurosci.* 29 (2009) 9740–9747.
- [8] A. Vo, W. Sako, M. Niethammer, M. Carbon, S.B. Bressman, A.M. Ulug, et al., Thalamocortical connectivity correlates with phenotypic variability in dystonia, *Cereb. Cortex* 25 (2015) 3086–3094.

- [9] W. Sako, K. Fujita, A. Vo, J.C. Rucker, J.R. Rizzo, M. Niethammer, et al., The visual perception of natural motion: abnormal task-related neural activity in DYT1 dystonia, *Brain* 138 (2015) 3598–3609.
- [10] F. Richter, A. Richter, Genetic animal models of dystonia: common features and diversities, *Prog. Neurobiol.* 121 (2014) 91–113.
- [11] N. Lange, M. Hamann, P. Shashidharan, A. Richter, Behavioural and pharmacological examinations in a transgenic mouse model of early-onset torsion dystonia, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 97 (2011) 647–655.
- [12] H. Jinnah, A. Richter, J.W. Mink, G.A. Caldwell, K.A. Caldwell, P. Gonzalez-Alegre, et al., Animal models for drug discovery in dystonia, *Expert Opin. Drug Discov.* 3 (2008) 83–97.
- [13] R.E. Goodchild, C.E. Kim, W.T. Dauer, Loss of the dystonia-associated protein torsinA selectively disrupts the neuronal nuclear envelope, *Neuron* 48 (2005) 923–932.
- [14] C.C. Liang, L.M. Tanabe, S. Jou, F. Chi, W.T. Dauer, TorsinA hypofunction causes abnormal twisting movements and sensorimotor circuit neurodegeneration, *J. Clin. Invest.* 124 (2014) 3080–3092.
- [15] A.M. Ulug, A. Vo, M. Argyelan, L. Tanabe, W.K. Schiffer, S. Dewey, et al., Cerebellothalamocortical pathway abnormalities in torsinA DYT1 knock-in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (2011) 6638–6643.
- [16] C.H. Song, D. Bernhard, C. Bolarinwa, E.J. Hess, Y. Smith, H.A. Jinnah, Subtle microstructural changes of the striatum in a DYT1 knock-in mouse model of dystonia, *Neurobiol. Dis.* 54 (2013) 362–371.
- [17] C.H. Song, D. Bernhard, E.J. Hess, H.A. Jinnah, Subtle microstructural changes of the cerebellum in a knock-in mouse model of DYT1 dystonia, *Neurobiol. Dis.* 62 (2014) 372–380.
- [18] G. Martella, M. Maltese, R. Nistico, T. Schirinzi, G. Madeo, G. Sciamanna, et al., Regional specificity of synaptic plasticity deficits in a knock-in mouse model of DYT1 dystonia, *Neurobiol. Dis.* 65 (2014) 124–132.
- [19] J. Gerstenberger, A. Bauer, C. Helmschrodt, A. Richter, F. Richter, The novel adaptive rotating beam test unmasks sensorimotor impairments in a transgenic mouse model of Parkinson's disease, *Behav. Brain Res.* 304 (2016) 102–110.
- [20] I. Magen, S.M. Fleming, C. Zhu, E.C. Garcia, K.M. Cardiff, D. Dinh, et al., Cognitive deficits in a mouse model of pre-manifest Parkinson's disease, *Eur. J. Neurosci.* 35 (2012) 870–882.
- [21] F. Richter, M. Hamann, A. Richter, Chronic rotenone treatment induces behavioral effects but no pathological signs of parkinsonism in mice, *J. Neurosci. Res.* 85 (2007) 681–691.
- [22] M.A. Hickey, M.-F.o. Chesselet, Behavioral Assessment of Genetic Mouse Models of Huntington's Disease. In: Emma L. Lane and Stephen B. Dunnett (eds.), *Animal Models of Movement Disorders: Volume II, Neuromethods*. 62 (2011) 3–19.
- [23] S.M. Fleming, J. Salcedo, P.O. Fernagut, E. Rockenstein, E. Masliah, M.S. Levine, et al., Early and progressive sensorimotor anomalies in mice overexpressing wild-type human alpha-synuclein, *J. Neurosci.* 24 (2004) 9434–9440.
- [24] H.A. Lam, N. Wu, I. Cely, R.L. Kelly, S. Hean, F. Richter, et al., Elevated tonic extracellular dopamine concentration and altered dopamine modulation of synaptic activity precede dopamine loss in the striatum of mice overexpressing human alpha-synuclein, *J. Neurosci. Res.* 89 (2011) 1091–1102.
- [25] L.M. Tanabe, C. Martin, W.T. Dauer, Genetic background modulates the phenotype of a mouse model of DYT1 dystonia, *PLoS One* 7 (2012) e32245.
- [26] M.T. Dang, F. Yokoi, K.S. McNaught, T.A. Jengelley, T. Jackson, J. Li, et al., Generation and characterization of Dyt1 DeltaGAG knock-in mouse as a model for early-onset dystonia, *Exp. Neurol.* 196 (2005) 452–463.
- [27] M.P. DeAndrade, A. Trongnetrpunya, F. Yokoi, C.C. Cheetham, N. Peng, J.M. Wyss, et al., Electromyographic evidence in support of a knock-in mouse model of DYT1 Dystonia, *Mov. Disord.* (2016).
- [28] M. Hamann, M. Bennay, M. Gernert, K. Schwabe, M. Koch, A. Richter, Decreased density of amygdaloid parvalbumin-positive interneurons and behavioral changes in dystonic hamsters (*Mesocricetus auratus*), *Behav. Neurosci.* 122 (2008) 36–43.
- [29] C.H. Song, X. Fan, C.J. Exeter, E.J. Hess, H.A. Jinnah, Functional analysis of dopaminergic systems in a DYT1 knock-in mouse model of dystonia, *Neurobiol. Dis.* 48 (2012) 66–78.
- [30] S.S. Pappas, K. Darr, S.M. Holley, C. Cepeda, O.S. Mabrouk, J.M. Wong, et al., Forebrain deletion of the dystonia protein torsinA causes dystonic-like movements and loss of striatal cholinergic neurons, *Elife* 4 (2015) e08352.

5 Diskussion

Für die Aufklärung pathophysiologischer Mechanismen zentralnervöser Erkrankungen des Bewegungsapparates und die Entwicklung erfolgsversprechender Therapieoptionen sind Tiermodelle essentiell. Ein aussagekräftiger und robuster Phänotyp gemäß der „face validity“ ist dabei von besonderer Bedeutung. Genetische Modelle der PD, wie z. B. weibliche Thy1-aSyn Mäuse, und der primären Torsionsdystonie des Menschen, wie beispielsweise DYT1 KI Mäuse, zeichnen sich zwar durch eine sehr hohe „construct validity“ aus, lassen aber oftmals einen starken Phänotyp vermissen. In der vorliegenden Arbeit sollte demzufolge untersucht werden, ob die Verhaltenstests zur Beurteilung sensomotorischer Funktionsstörungen im Vergleich zu vorwiegend motorischen Verhaltensanalysen dazu in der Lage sind, einen validen Phänotyp in diesen beiden Modellen aufzudecken. Die Hauptergebnisse der zwei Publikationen, als Bestandteile dieser kumulativen Dissertation, können wie folgt zusammengefasst werden:

Publikation 1:

- Weibliche Thy1-aSyn Tiere exprimierten signifikant weniger humane α -Synuclein-mRNA in der Substantia nigra im Vergleich zu den transgenen Männchen.
- Auf dem „pole test“ und dem „challenging beam test“ brachten die weiblichen Thy1-aSyn Mäuse im Vergleich zu den Wildtypen keine motorischen Auffälligkeiten hervor, währenddessen die männlichen transgenen Tiere, verglichen zur Kontrollgruppe, signifikante Beeinträchtigungen der Motorik auf diesen Verhaltenstests aufzeigten.
- Der adaptive rotierende Balkentest (ARB-Test, „adaptive rotating beam test“) als ein neuer Verhaltenstest für Mäuse, der die sensomotorischen Integration impliziert, konnte erfolgreich etabliert werden.
- Dieser neue ARB-Test deckte signifikante motorische Defizite bei den transgenen Mäusen beider Geschlechter im Unterschied zu den Wildtypen auf.
- Der genetische Hintergrund (reiner C57Bl/6J-Hintergrund sowie gemischter C57Bl/6J \times DBA2-Hintergrund) von Wildtyp-Mäusen hatte einen Einfluss auf die motorischen Fähigkeiten im „challenging beam test“, „pole test“ und im ARB-Test.

Publikation 2:

- In männlichen DYT1 KI Tieren konnten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe in Verhaltenstests festgestellt werden, die vornehmlich die reine Motorik (Offenfeld-Test, „challenging beam test“, „pole test“, Block-Test, Zylinder-Test, Nestbau-Test) bzw. Kognition („y maze test“) analysieren.

- Im sensomotorischen „adhesive removal test“ und ARB-Test konnten signifikante Defizite in den männlichen Mutanten, verglichen zu den Wildtyp-Wurfgeschwistern, nachgewiesen werden.

5.1 Aspekte zur Methodik

Um einen sensitiven Verhaltenstest zu entwickeln, der feinmotorische Fähigkeiten unter Implementierung der sensomotorischen Integration analysieren kann, wurde der ARB-Test entwickelt, der später an Mausmodellen getestet werden sollte, die auf bisherigen standardisierten Testapparaturen keinen offensichtlichen motorisch beeinträchtigten Phänotyp aufzeigten. Bei der Konstruktion des neuen Testsystems flossen verschiedene Aspekte des Aufbaus und Ablaufs anderer motorischer Verhaltensmethoden ein. Dazu zählte insbesondere der „challenging beam test“, der ebenfalls aus einem ca. 20 cm erhöhten Horizontalbalken besteht, welcher in den Heimkäfig der Tiere führt (FLEMING et al. 2004). Auch in diesem dreitägigen Test wurden die Tiere in jeweils fünf Durchgängen zunächst an die Überquerung des Balkens gewöhnt, währenddessen lediglich der dritte Versuchstag mit der Schwierigkeitserhöhung durch den aufgebrachten Maschendraht für die Ergebnisanalyse aufgezeichnet wurde. Die Auswertung erfolgte hinsichtlich der Fehler pro Schritt (diese bestanden in einem Hindurchrutschen der Gliedmaßen durch den Gitterdraht), der benötigten Überquerungszeit und der Anzahl an Schritten. Andere Balkentests beinhalteten bereits Rundstäbe verschiedener Durchmesser, die i.d.R. aus Holz bestanden (CARTER et al. 1999, DLUZEN et al. 2001). Daneben fand, ausgenommen vom Rotarod, die Einbeziehung der Rotation der Stäbe mit variabler Geschwindigkeit in Verhaltenstests für Mäuse bislang wenig Anwendung. Ein rotierender Stabtest („rotating beam“) für Mäuse wurde allerdings bereits zur Evaluierung des Zusammenhangs zwischen der Kontrolle von Körperposition und Gleichgewicht und dem Angstverhalten der Tiere angewandt (LEPICARD et al. 2000). Zur Bewegungsmotivation wurde den Tieren am Ende des Stabes Futter zur Verfügung gestellt, nachdem zuvor eine mehrtägige Futterrestriktion erfolgte. Im dreitägigen Training bestanden die Stäbe bei diesem Test aus Holz, am vierten Tag wurden längere Metallstäbe mit verringertem Durchmesser verwendet, die mit konstanter Geschwindigkeit rotierten. Die Analyse der Performance der Tiere konzentrierte sich v. a. auf die Messung der Körperhaltung sowie die Anzahl an Imbalancen und Stürzen. Darüber hinaus kam bei Rattenmodellen für Hirninfarkte ein „rotating pole“ zum Einsatz, der aufgrund der größeren Spezies vergleichsweise größere Durchmesser und Längen aufwies, sich in 70 cm Höhe befand und bei einer konstanten Rotationsgeschwindigkeit die Drehrichtung wechselte (OHLSSON und JOHANSSON 1995). Hier wurde bereits eine Punkteskala von null (Hinunterfallen vom Stab) bis sechs (erfolgreiches Überqueren des Stabes ohne Wegrutschen) für die Evaluierung der motorischen Koordination angewandt. Der in der vorliegenden Arbeit etablierte ARB-Test zeichnete sich v. a. durch die Einbeziehung vielfältiger, sich ändernder Stimuli (Stabmaterial und –durchmesser, Drehgeschwindigkeit und –richtung) aus, die die korrekte Verarbeitung sensorischer Informationen für die erfolgreiche Ausübung der Aufgabe

erforderten. Er bedurfte durch die Zuhilfenahme des Heimkäfigs als Motivation keiner Futterrestriktion und war weniger stark vom Körpergewicht und der Griffstärke der Tiere abhängig als z. B. der „pole test“. Zudem konnte er die motorischen Fähigkeiten dadurch objektiver untersuchen im Gegensatz zu Verhaltenstests wie dem Rotarod, auf dem die Tiere nicht freiwillig zur Fortbewegung animiert werden. Durch die Herabsetzung der Stabhöhe auf 20 cm konnte der Einfluss des Angstverhaltens reduziert, wenn auch nicht ausgeschlossen werden. Da die Apparatur für den ARB-Test nicht kommerziell verfügbar ist, wurde er in Eigenarbeit konstruiert und gebaut, wobei die o. g. Testsysteme entsprechend modifiziert wurden. Die Auswertung anhand eines Punktesystems sollte eine adäquate Repräsentation der motorischen Performance der Mäuse wiedergeben. Zur Entwicklung der Bewertungsskala mit den entsprechend angepassten Spannbreiten der Punktzahlen wurde die Schwierigkeit der jeweiligen Versuchsbedingungen erfasst. Je weniger Tiere in der Lage waren unter den gewählten Parametern den Stab zu überqueren, desto höher wurde die Punktzahl gewählt. Aus diesem Grund fiel beispielsweise ein erfolgreiches Überqueren des rotierenden Stabes bei wechselnder Drehrichtung mit viermal so vielen Punkten ins Gewicht wie die Erhöhung der Umdrehungszahl pro Minute um einen Grad. Ein ein- oder maximal zweimaliges Hinunterfallen der Tiere vom Stab, gerade zu Beginn des Testes am nächstfolgenden Versuchstag, konnte durch eine erneute Habituation der Tiere durchaus stattfinden, ohne in einem unmittelbaren Zusammenhang mit Beeinträchtigungen der Sensomotorik zu stehen. Deshalb wurden diese Misserfolge lediglich mit einem Abzug von zwei bis vier Punkten versehen. Im Gegensatz zum Punktesystem des o. g. „rotating pole tests“ führte erst ein dreimaliger Sturz im ARB-Test zum Ende des Versuches, der dann mit null Punkten bewertet wurde. Die Erfolge unter den weniger anspruchsvollen Versuchsbedingungen zuvor wurden dabei allerdings nicht gelöscht. Das komplexere Bewertungssystem zum einen und die individuell an jedes Einzeltier angepassten Versuchsabläufe zum anderen boten die Möglichkeit einer detailgenaueren Evaluierung sensomotorischer Dysfunktionen, die sich dadurch deutlich von dem simpleren Schema mit sieben Einheiten des „rotating pole tests“ unterschied (OHLSSON und JOHANSSON 1995). Außerdem kann der Test um zahlreiche weitere Analyseoptionen, wie die Beurteilung des motorischen Lernens („memory retention“) innerhalb der verschiedenen Versuchstage, die Messung der Körperposition und Überquerungszeit sowie das Auszählen der Schritte, Stürze und des Wegrutschens auf dem Stab erweitert werden. Das Problem einer Quantifizierung dieser letzteren Parameter besteht allerdings darin, dass eine genaue Vergleichbarkeit nur bei Tieren möglich wäre, die den gleichen Stab zugewiesen bekommen haben. Auch für Substanzversuche ist diese Vergleichbarkeit ein limitierender Faktor, da sich eine Verbesserung oder Verschlechterung der Mäuse post injectionem auf verschiedenen Stäben wahrscheinlich in unterschiedlichem Ausmaß verhält. Im Vergleich zu motorischen Verhaltenstests, die oft nur ausgewählte Fähigkeiten analysieren, kommen im ARB-Test zahlreiche Einflusskriterien zum Tragen, wie die Koordination, Balance oder Adaptationsfähigkeit (CRAWLEY 1999). Bei einer fokussierten Auswertung der Videoaufnahmen können dadurch in einem einzigen Test

schwerpunktorientiert auch vielfältige Einzelkriterien betrachtet und auf eine Durchführung weiterer Verhaltensversuche verzichtet werden. Eine mögliche Grenze des ARB-Tests könnten Tiermodelle mit einem sehr stark beeinträchtigten Phänotyp darstellen, für die die Versuchsbedingungen möglicherweise zu anspruchsvoll sind. Diese Limitierung trifft auch für andere motorische Verhaltenstests zu, z. B. den „pole test“ oder den „challenging beam test“. Ein großer Vorteil des ARB-Tests zeigt sich in der Option einer Anpassung des Protokolls und Punktesystems an Mausmodelle mit starken Defiziten der Motorik allgemein oder aber mit Schwierigkeiten bestimmter Einzelaufgaben, wie z. B. der Drehrichtung oder –geschwindigkeit. Dabei könnte die Bewertungsskala so variiert werden, dass die große Spannbreite der Beurteilung motorischer Fähigkeiten der Tiere trotz Eingrenzung der Testbedingungen auf weniger schwierige Aufgaben beibehalten wird. Dennoch ist der sensitive Versuchsapparat hauptsächlich für Tiermodelle mit geringgradigen motorischen Beeinträchtigungen sowie der Beteiligung von Dysfunktionen des sensomotorischen Systems zu empfehlen. Ein weiterer Nachteil des ARB-Tests besteht in der schlechten bis unmöglichen Desinfektion des Holzstabes, welcher theoretisch bei jedem Tier ausgetauscht werden müsste, um olfaktorische und soziale Störfaktoren auf die Tiere auszuschließen. Auch die Lautstärke des Apparatemotors, die mit zunehmender Umdrehungszahl ansteigt, sowie kognitive Einflüsse könnten sich auf das Verhalten der Tiere auf dem Test auswirken und müssen bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden. Letztlich muss auch die Objektivität bei der Bewertung durch den Versuchsdurchführenden kritisch hinterfragt werden, da beispielsweise ein Hinunterfallen der Mäuse vom Stab nur dann gezählt wurde, wenn die Tiere in Bewegung waren. Es empfiehlt sich demnach, die Anzahl der Untersucher in einer Studie so gering wie möglich zu halten.

Bei der Auswahl der Verhaltenstests, die im unmittelbaren Vergleich zu dem neuen ARB-Test stehen sollten, wurde der „challenging beam test“ sowie der „pole test“ ausgewählt, da diese in der Literatur als sensitive Verfahren beschrieben sind und sich bei den männlichen Thy1-aSyn Tieren bewährt haben (FLEMING et al. 2004). Um zu überprüfen, ob die Weibchen auch in anderen sensomotorischen Tests keine Auffälligkeiten aufzeigen, hätte der Umfang der Phänotypisierung z. B. auf das Rotarod und den „adhesive removal test“ ausgeweitet werden können, da in der Literatur bislang lediglich die Ergebnisse von Verhaltensuntersuchungen der weiblichen Thy1-aSyn Mäuse auf dem „challenging beam test“ existieren (CHESSELET et al. 2012). Weil allerdings die Etablierung des ARB-Tests im Fokus stand und aus Tierschutzaspekten die Versuche nicht unnötig ausgedehnt werden sollten, blieb es bei der Beschränkung auf die o. g. Verfahren. Im Versuchsdesign sind darüber hinaus die Reihenfolge der durchgeführten Tests, die heterogene Altersverteilung der Tiere sowie die unterschiedliche Anzahl an Versuchstieren kritisch zu hinterfragen. Da nicht auszuschließen ist, dass die beiden bereits etablierten Versuche, die zu Beginn durchgeführt wurden, einen Effekt auf die Performance der Mäuse im anschließend durchgeführten ARB-Test hatten, müssten die Versuche im neuen Test isoliert durchgeführt werden. Der Einfluss

hierbei könnte darin bestehen, dass die ersten Verhaltenstests eine Art Training der Mäuse darstellten. Gegen diese These spricht allerdings die Leistungsminderung der transgenen Tiere auf dem ARB-Test. Demgegenüber könnten die vorangehenden Tests auch einen Stressfaktor darstellen, der Verhaltensauffälligkeiten der Tiere in nachfolgenden Tests provoziert, was bislang bei dem verwendeten Mausmodell für die PD jedoch noch nicht beschrieben wurde. In den konventionellen Verhaltenstests streute das Alter der Tiere zwischen drei und sechs Monaten, zum Zeitpunkt der Testung auf dem ARB-Test hingegen waren alle Mäuse einheitlich sechs Monate alt. Da keine Korrelation zwischen dem Alter und dem Verhalten in den ersten beiden Versuchen zu verzeichnen war, kann davon ausgegangen werden, dass diese Schwankungen keine nennenswerten Auswirkungen auf die Ergebnisse hatte. Demgegenüber wurde die Ungleichheit der Versuchstierzahl der jeweiligen Tiergruppen bewusst gewählt. Bei den männlichen Thy1-aSyn Mäusen waren aufgrund des starken Phänotyps weniger Tiere im Vergleich zu den motorisch geringer beeinträchtigten Weibchen dieses Modells nötig, um einen signifikanten Unterschied zwischen den Genotypen zu erreichen. Auch bei den Wildtypen der verschiedenen Hintergrundstämme wurde eine höhere Anzahl an Tieren veranschlagt, um eine möglichst hohe Aussagekraft in den durchgeführten Verhaltensanalysen zu erzielen.

In der zweiten Publikation wurden zur Analyse der Sensomotorik der „adhesive removal test“ sowie der ARB-Test durchgeführt, welche die sensomotorische Integration implizierten. Vergleichsweise wurden Verhaltenstests durchgeführt, die als rein motorische Tests gelten (BROOKS und DUNNETT 2009). Dieser Vergleich eignet sich allerdings nur bedingt, da auch bei den vorwiegend motorischen Versuchen exogene Faktoren Einfluss nehmen. Der „challenging beam test“ beispielsweise integriert durch das Gittergeflecht am dritten Versuchstag einen neuen sensorischen Stimulus und auch im Nestbau-Test, der die Watte als neues, für die Tiere unbekanntes Material einbezieht, fließen sensorische Komponenten in den Versuch mit ein. Trotz der beschriebenen kritischen Betrachtungsweise ist die Einstufung von Verhaltenstests bezüglich Motorik und Sensomotorik in der Literatur nicht unüblich (CURZON et al. 2009). Mithilfe des bereits gut etablierten „adhesive removal tests“ konnten sensomotorische Verschaltungen untersucht werden. Die Messung einer ersten Kontaktzeit sowie einer zweiten Zeit, bis die Tiere den Sticker entfernen konnten, ermöglichte eine Unterscheidung zwischen Defiziten der Perzeption und Signalverarbeitung und der Beurteilung motorischer Funktionen. Um den Test zu verfeinern und äußere Einflüsse zu minimieren, hätten die Mäuse an den neuen Käfig, in den sie während des Versuches gesetzt wurden, zuvor habituiert werden können (BOUET et al. 2009). Die Mittelung dreier Einzelwerte hat sich als geeignet herausgestellt, um Schwankungen, insbesondere innerhalb der ersten beiden Versuche auszugleichen. Diese Variabilität hätte möglicherweise durch die Gewöhnung an den neuen Käfig minimiert werden können. In anderen Protokollen wurden lediglich ein oder zwei Durchgänge am Versuchstag beschrieben, was eine sehr sorgfältige Versuchsdurchführung verlangt und die Aussagekraft der Ergebnisse möglicherweise

schmäkelt (FLEMING et al. 2004, BOUET et al. 2009). In einigen Studien wurden die Tiere im Vorfeld mehrere Tage trainiert, um Angsteinflüsse zu minimieren. Außerdem wurde der Aufkleber zusätzlich an den Vordergliedmaßen angebracht (SCHAAR et al. 2010). Die Trainingsphase birgt allerdings die Gefahr einer Habituation und eines Lerneffektes, weshalb in den Experimenten darauf verzichtet wurde. In zukünftigen Untersuchungen könnten diese allerdings durch die Platzierung des Stickers auf anderen Körperregionen ergänzt und mit den bisherigen Daten verglichen werden. Dadurch würden visuelle Einflussparameter, die durch die Positionierung auf dem Nasenrücken nicht vernachlässigt werden können, minimiert werden. Eine erhöhte Latenzzeit im „adhesive removal test“ muss nicht auf Defiziten der Wahrnehmung basieren, sondern kann beispielsweise auch durch eine gestörte Initiation der Bewegung verursacht werden, wie es bei der PD zu beobachten ist. Diese initiativen Störungen der Motorik konnten durch den Block- bzw. Katalepsie-Test ausgeschlossen werden, was die Bedeutung der Durchführung multipler Tests zur Analyse der Sensomotorik hervorhebt. Im Vergleich zum „adhesive removal test“ eignete sich der ARB-Test besser, um die sensomotorische Integration zu untersuchen, da vielfältige, sich ändernde Parameter in den Versuch mit einfließen (s. oben). Für eine weiterführende Überprüfung sensorischer Funktionen könnte sich in anschließenden Untersuchungen z. B. der Präpulsinhibitionstest eignen (CURZON et al. 2009). Zur speziellen Analyse der Motorik wurden sensitive Verhaltenstests ausgewählt, die eine große Spannbreite an motorischen Fähigkeiten überprüften. Der Offenfeld-Test konnte das natürliche Verhalten der Tiere ohne den Einfluss eines permanenten Handlings quantifizieren. Da er zu Beginn der Testreihe durchgeführt wurde, wurden exogene Einwirkungen auf die Ergebnisse reduziert. Oftmals wurden die Tiere nur über wenige Minuten im Offenfeld getestet, was die Fokussierung auf neuartige Umweltbedingungen in den Vordergrund rückt. Nach 15 Minuten haben sich die Mäuse schon eher an diese gewöhnt und das natürliche Aktivitätsverhalten kann evaluiert werden. Außerdem wird der Informationsgewinn durch die Möglichkeit einer ausführlicheren Auswertung von Zeitintervallen erhöht. Durch die Ausdehnung der Versuchszeit über 24 Stunden kann dieser noch weiter gesteigert werden. Da für die DYT1 KI Mäuse allerdings bereits Daten hierfür existieren (SONG et al. 2012), wurde darauf verzichtet. Die Auswertung mithilfe der Tracking-Software, im Gegensatz zu einer manuellen Begutachtung eines Untersuchers, ermöglichte eine objektive Beurteilung der Parameter. In einem etablierten Drahtzylinder-Test konnte das Kletterverhalten der Tiere quantifiziert werden. Für diesen Test eignete sich die Auswertung durch einen Untersucher eher, da subtile Veränderungen der Benutzung von Gliedmaßen und Pfoten sowie der Haltung detailgenau interpretiert werden konnten. Zusätzlich war es auch möglich, gröbere Kriterien, wie Inaktivitätsphasen der Mäuse, zu protokollieren. Da die Tiere in den Versuchen stärker einem unmittelbaren Beobachter ausgesetzt waren, wurde der Nestbau-Test im Tierhaltungsraum über zwölf Stunden ohne permanente Überwachung der Mäuse durchgeführt. In einigen Studien wurden Daten über 72 Stunden gesammelt (CHESSELET et al. 2012). Um den Stress für die Tiere durch eine Einzelhaltung zu minimieren, wurde in dieser Testreihe ein Versuchszeitraum von

zwölf Stunden gewählt. Da der Großteil der Tiere bis dahin bereits das gesamte Nistmaterial in den Käfig ziehen konnte, stellte sich die vorgenommene Zeitminderung als geeignet heraus. Die Auswahl des Nistmaterials muss kritisch eingeschätzt werden, da die Versuchstiere zuvor keinen Kontakt zu Watte hatten. Eine Gewöhnungsphase an Watte oder die alternative Verwendung von für die Mäuse bekanntem zerkleinertem Papier hätte den Versuch optimiert. Da die Tiere das Material allerdings gut angenommen haben, schien dieser Einfluss keine großen Auswirkungen auf die Ergebnisse genommen zu haben, muss allerdings bei der Interpretation berücksichtigt werden. Um die Testbatterie auszudehnen, hätte sie beispielsweise um den Treppen-Test, das Rotarod, die Analyse von Fußabdrücken oder den Schwimmtest ergänzt werden können. Allerdings hätte der zusätzliche Informationsgewinn den zunehmenden Stress der Tiere durch eine Erhöhung des Versuchszeitraumes vermutlich nicht aufgewogen. Überdies wurde bereits eine Vielzahl dieser zuletzt aufgeführten Verhaltensversuche an dem Mausmodell durchgeführt, allerdings ohne nennenswerte Genotyp-Effekte (DANG et al. 2005, YOKOI et al. 2009, SONG et al. 2012). Kognitive Beeinträchtigungen können einen erheblichen Einfluss auf die Ergebnisse motorischer Verhaltensuntersuchungen nehmen (CRAWLEY 2007). Um eine Aussage über Störungen der Kognition der Tiere treffen zu können, wurde der „y-maze test“ angewandt, welcher das räumliche Kurzzeitgedächtnis quantifiziert. Für einen umfassenderen Einblick in kognitive Funktionen bei DYT1 KI Mäusen hätten jedoch weiterführende Verhaltenstests, wie der „novel object recognition test“, das Wasserlabyrinth oder Differenzierungsaufgaben verwendet werden müssen (CRAWLEY 2008).

Die Reihenfolge der Versuche wurde so gewählt, dass die stör anfälligsten Tests, wie das Offenfeld oder der „y-maze test“, zu Beginn durchgeführt wurden, während stressverursachende Abläufe, wie es für den „adhesive removal test“ zutrifft, zuletzt realisiert wurden. Ein Nachteil ergab sich durch die mögliche Trainingswirkung der ersten auf die zuletzt durchgeführten Versuche (s. o.), weshalb die Verhaltenstests für eine genaue Beurteilung einzeln wiederholt werden mussten. Das Alter der Tiere (drei bis sechs Monate) wurde gewählt, da aus Angaben der Literatur bei drei Monate alten Mäusen dieses Modells lediglich geringgradige Abweichungen zu verzeichnen waren (SONG et al. 2012). Demgegenüber zeigten sechs Monate alte KI Tiere des gemischten Hintergrundes signifikante Beeinträchtigungen im Balkentest (DANG et al. 2005). Für eine detailliertere Phänotypisierung müssten Tiere vielfältiger Altersstufen untersucht werden. Insbesondere weil die DYT1-Dystonie zwischen dem fünften und 28. Lebensjahr auftritt, sollten Mäuse vergleichbar jüngeren Alters (etwa ab sechs Wochen) erneut die Verhaltensstudien durchlaufen.

5.2 Ergebnisse

In der ersten Publikation konnte zunächst mithilfe quantitativer Echtzeit-PCR eine 1,5-fache Überexpression des Transgens bei den weiblichen Thy1-aSyn Mäusen im Vergleich zu den

Kontrolltieren in der Substantia nigra (SN) nachgewiesen werden. Demgegenüber zeigten die männlichen Tiere eine 3-fache Überexpression. Da das Protein auch in zahlreichen anderen Gehirnregionen akkumuliert, ist zu vermuten, dass die nachgewiesene mRNA-Expression von α -Synuclein in der SN stellvertretend für andere Hirnregionen steht, was allerdings durch eine Wiederholung der Untersuchungen für andere Strukturen bestätigt werden müsste (DELENCLOS et al. 2014). Die geringere Überexpression bei weiblichen im Vergleich zu männlichen Tieren unterstützte die Hypothese, dass die fehlenden motorischen Defizite auf die oben beschriebene Insertion von humanen α -Synuclein in das X-Chromosom zurückzuführen sein könnten (CHESSELET et al. 2012). Die pathophysiologischen Befunde in diesem Mausmodell, zu denen Abweichungen der kortikostriatalen synaptischen Plastizität und Kommunikation zählen, ließen hingegen keine Geschlechtsunterschiede erkennen (WATSON et al. 2009, WU et al. 2010). Diese Diskrepanz zwischen Pathophysiologie und motorischem Phänotyp ist kein seltenes Phänomen und wird in multiplen Tiermodellen für Bewegungsstörungen beschrieben (CHESSELET und RICHTER 2011, RICHTER und RICHTER 2014, HATAMI und CHESSELET 2015). Unter anderem wurden Kompensationsmechanismen auf verschiedenen Ebenen als Erklärungsansatz diskutiert. Nager als Flucht- und Beutetiere, die sich im Vergleich zum Menschen auf vier Gliedmaßen fortbewegen, sind möglicherweise in der Lage, milde Beeinträchtigungen der Motorik zu maskieren (RICHTER und RICHTER 2014). Auch eine Kompensation auf genetischer Ebene kommt in Frage, wobei redundante Gene die Dysfunktionen, die durch zielgerichtete Gendefekte evoziert werden, ausgleichen könnten (CRAWLEY 1999). Ein weiterer Aspekt, der für die verminderten Verhaltensauffälligkeiten der Weibchen mitverantwortlich sein könnte, stellt eine größere Schwankung innerhalb der Tiergruppe dar, die durch den Östruszyklus provoziert werden kann (MEZIANE et al. 2007). Aus diesem Grund verzichten viele Forscher auf die Verwendung weiblicher Versuchstiere, was dazu führt, dass die Untersuchung geschlechtsspezifischer Pathomechanismen limitiert wird. Auf dem „challenging beam test“ und dem „pole test“ konnten im Gegensatz zu den männlichen Mutanten bei den Weibchen keine signifikanten motorischen Dysfunktionen nachgewiesen werden, was durch die eigenen Untersuchungen bestätigt wurde (CHESSELET et al. 2012). Mit dem neuen ARB-Test war es hingegen in beiden Geschlechtern möglich, signifikante Beeinträchtigungen der Sensomotorik im Vergleich zu den entsprechenden Wildtypen aufzudecken. Die erhöhte Sensitivität des ARB-Tests sowie die Einbeziehung vielfältiger, sich ändernder sensorischer Stimuli könnte für die unterschiedlichen Leistungen der weiblichen Tiere im Gegensatz zu den bereits etablierten Verhaltensversuchen verantwortlich sein. Das Ergebnis lässt weiterhin schlussfolgern, dass eine Kompensation motorischer Fehlfunktionen in hohem Maße von der korrekten Integration sensorischer Informationen bei der Ausübung der Motorik abhängen könnte. Diese Theorie wird durch klinische Untersuchungen an PD-Patienten unterstützt, deren erfolgreiche motorische Bewegungsumsetzung in verschiedenen Untersuchungen erheblich von sensorischen, insbesondere visuellen Signalen abhängig war (ABBRUZZESE und BERARDELLI 2003).

Die Leistung der Mutanten auf dem ARB-Test, verglichen mit jener der Wildtypen, korrelierte mit den quantitativen Analysen der Transgenexpression. Während die männlichen Thy1- α Syn Mäuse am dritten Tag des Tests nur etwa zehn % der Punktzahl der Kontrolltiere erreichte, waren es bei den weiblichen transgenen Tieren circa 50 %. Dieses Verhältnis unterstützt zusätzlich den Verdacht, dass die verminderten Verhaltenssymptome der Weibchen in Wechselbeziehung zur geringeren Überexpression von humanem α -Synuclein stehen.

Der Vergleich von Wildtyp-Mäusen verschiedener Hintergrundstämme brachte einige Unterschiede bezüglich der (Sens-) Motorik zum Vorschein. Innerhalb der Mausgruppe des gemischten C57Bl/6J \times DBA2-Hintergrundes konnten jedoch kaum geschlechtsspezifische Differenzen auf den drei Verhaltenstests beobachtet werden. Demnach lassen sich die Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Mutanten dieses Stammes nicht primär mit Geschlechtsvarianzen von Kontrolltieren erklären. Interessanterweise und besonders auffällig im „challenging beam test“ stellte sich der reine C57Bl/6J-Hintergrund als motorisch weniger leistungsstark heraus. In der Literatur sind C57Bl/6J-Mäuse hingegen als sehr aktiv bekannt und schneiden in motorischen Verhaltensstudien oft übermäßig stark ab, vor allem im Vergleich zu dem DBA2 Hintergrund. Dies wurde u. a. in Untersuchungen auf dem Rotarod, im Offenfeld oder im Morris-Wasserlabyrinth deutlich (ROGERS et al. 1999, TARANTINO et al. 2000, BROOKS et al. 2004). Des Weiteren zeigten Tiere des DBA2-Stammes, verglichen mit Mäusen des reinen C57Bl/6J-Hintergrundes, in einigen Studien ein erhöhtes Angstverhalten (CRAWLEY et al. 1997). Insgesamt zeigten die schlechteren Ergebnisse der C57Bl/6J-Mäuse im Vergleich zu Tieren des gemischten Hintergrundstammes, dass die durchgeführten Versuche weniger vom Aktivitätsverhalten der Mäuse abhingen, sondern vielmehr die motorische Geschicklichkeit und Koordination untersuchten. Zudem unterstützt die höhere Leistung der C57Bl/6J \times DBA2-Mäuse auf dem ARB-Test im Vergleich zu den C57Bl/6J-Tieren die These, dass das Angstverhalten auf die (Sens-) Motorik in diesem Versuch keinen erheblichen Einfluss zu scheinen hatte. Bei der Auswertung und Interpretation motorischer Verhaltensanalysen transgener Mausmodelle sind Unterschiede, die durch den Einfluss des Hintergrundstammes oder Geschlechts verursacht werden könnten, demnach stets zu berücksichtigen. Ferner sollten die bereits bekannten Verhaltensunterschiede der diversen genetischen Hintergrundlinien bei der Entwicklung und Auswahl neuer Tiermodelle bedacht werden (CRAWLEY et al. 1997).

Zusammenfassend konnte mit der vorliegenden ersten Arbeit die Bedeutung der sensomotorischen Integration für die Ausprägung motorischer Defizite, aber eventuell auch für die Kompensation solcher motorischer Beeinträchtigungen, herausgehoben werden (GERSTENBERGER et al. 2016). Möglicherweise kann diesem Sachverhalt in anderen Mausmodellen für Bewegungsstörungen, die keinen evidenten Phänotyp zeigen, nachgegangen werden. Für die Aufdeckung eines solchen Endophänotyps hat sich der neu entwickelte, sensitive ARB-Test bei dem hier verwendeten PD-Modell bewährt. Damit

können die weiblichen Tiere dieses Modells in zukünftigen Untersuchungen ebenfalls verwendet werden und eignen sich offensichtlich gut, um die pathophysiologischen Signalwege, die den veränderten sensomotorischen Funktionen zugrunde liegen, zu erforschen. Da es sich hierbei um Symptome der prämotorischen Phase vor dem Dopaminverlust handelt, könnte die Untersuchung von Dysfunktionen der sensomotorischen Integration auch bei der Entwicklung neuer Teststrategien der Frühzeitdiagnostik von Risikopatienten beitragen.

In der zweiten vorliegenden Publikation zeigten die Analysen der vorwiegend motorischen Verhaltensuntersuchungen keine signifikanten Dysfunktionen in den DYT1 KI Mäusen, verglichen zur Kontrollgruppe (RICHTER et al. 2016). Die Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit Verhaltensstudien von TANABE und Mitarbeitern (2012), in denen die Mutanten dieses reinen C57Bl/6J-Hintergrundes keine signifikanten Unterschiede zu den Wildtypen im Offenfeld-Test, auf dem Balkentest und dem Rotarod zeigten. In einer anderen Arbeit konnten bei den Tieren wiederum geringfügige Beeinträchtigungen am ersten Tag des Rotarod-Trainings sowie auf dem Balkentest detektiert werden (SONG et al. 2012). DYT1 KI Mäuse des gemischten 129/SvJ x C57BL/6-Hintergrundstammes zeigten sich demgegenüber hyperaktiv im Offenfeld und zeichneten sich durch ein vermehrtes Wegrutschen auf dem Balkentest aus (DANG et al. 2005). Diese Unterschiede unterstützen auch die eigenen Untersuchungen zu abweichenden motorischen Fähigkeiten verschiedener Hintergrundstämme (s. o.). Der immense Einfluss des genetischen Hintergrundes der Tiere auf deren Phänotyp wurde bei dem DYT1 KI Modell neben der Motorik u. a. auch in der Lebenserwartung homozygoter Mutanten deutlich (TANABE et al. 2012). Eine Erklärung für die abweichenden Resultate auf den o. g. Verhaltenstests können zum anderen die verschiedenen Versuchsbedingungen, insbesondere bezüglich des Balkentests darstellen. Um die motorischen Funktionen der Mäuse in den eigenen Untersuchungen präzise zu evaluieren, wurden vielfältige und sehr sensitive Verhaltensmethoden ausgewählt. Der Balkentest, der im Vergleich zu den oben beschriebenen Arbeiten durch das Aufbringen eines Drahtgeflechtes auf den sich verjüngenden Plastikbalken verfeinert wurde, war in der vorliegenden Arbeit allerdings ebenso wenig in der Lage motorische Defizite bei den KI Mäusen aufzudecken wie die anderen durchgeführten Untersuchungen zur Beurteilung motorischer Fähigkeiten. Als Ursache für diesen fehlenden motorisch beeinträchtigten Phänotyp kommen, ähnlich zu den oben geschilderten Ausführungen, verschiedene Kompensationsmechanismen in Frage. Ein Verschleiern von unspezifischen Fehlfunktionen der Motorik kann auch auf das tägliche Training im Heimkäfig zurückzuführen sein. Die Anreicherung des Lebensumfeldes („environmental enrichment“) hat dabei einen nachweislichen Effekt auf die synaptische Plastizität, die Genexpression und auf das Verhalten der Tiere (LEWIS 2004, NITHIANANTHARAJAH und HANNAN 2006, HANNAN 2014). In einem Rattenmodell für die PD wurde beispielsweise durch diese Art der Umgebungsgestaltung eine Verbesserung motorischer Symptome nachgewiesen, in einem Huntington-Modell verzögerte sich hierdurch

das Einsetzen der Symptomatik (VAN DELLEN et al. 2000, JADAVJI et al. 2006). Möglicherweise sind die durchgeführten Verhaltenstests aber auch immer noch nicht sensitiv genug und eignen sich eher für Tiermodelle, die offensichtlichere Störungen des Bewegungsapparates ausbilden. Eine weitere Erklärung könnte zudem die Hypothese sein, dass die Δ GAG-Deletion im DYT1-Gen nicht die einzige Schlüsselrolle bei der Entwicklung motorischer Bewegungsstörungen spielt, sondern dass zusätzliche epigenetische Faktoren oder Umwelteinflüsse daran beteiligt sind (EDWARDS et al. 2003). Im Hinblick auf die unvollständige Penetranz der Erkrankung von etwa 30 % bei humanen Genträgern ist die Aufdeckung von robusten Symptomen im Tiermodell möglicherweise per se erschwert und setzt sehr hohe Tierzahlen für die Verhaltensanalysen voraus, um signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen hervorzubringen. Im Gegensatz zu dieser überwiegend motorischen Testbatterie zeigten die beiden Verhaltenstests zur Analyse der Sensomotorik signifikante Beeinträchtigungen bei den DYT1 KI Mäusen im Vergleich zu den Wildtypen. Im „adhesive removal test“ benötigten die Mäuse signifikant mehr Zeit für die Entfernung des Aufklebers, wobei die erste Latenzzeit bis zum Berühren des Stickers und die zweite Zeit, die das Entfernen des Aufklebers misst, identisch waren. Die Ergebnisse sprechen folglich eher für ein sensorisches Defizit, da bei einer motorischen Funktionsstörung eine Differenz zwischen den beiden Messzeitpunkten zu erwarten wäre. Da im Block-Test keine Hinweise für kataleptisches Verhalten der DYT1 KI Mäuse gefunden werden konnten, ist eine gestörte Bewegungsinitiation als Ursache für die Defizite im „adhesive removal test“ weitestgehend auszuschließen. Erstmals konnten mit diesen Ergebnissen sensomotorische Dysfunktionen in einem Nagerrmodell für die primäre Torsionsdystonie nachgewiesen werden. Interessanterweise zeigten DYT1 KI Mäuse im Präpulsinhibitionstest keine Veränderungen in der sensomotorischen Steuerung (YOKOI et al. 2009). Dies weist darauf hin, dass bei den Tieren nur bestimmte Bahnen sensomotorischer Verschaltungen beeinträchtigt sind. Demgegenüber konnten auch in wenigen anderen Modellen sensorische Defizite aufgezeigt werden. Weibliche heterozygote *Atp1a3*-Mäuse als Modell für die DYT12-Dystonie zeigten Beeinträchtigungen im Schwanzbewegungstest („tail flick test“), während der *dt^{sz}*-Hamster als Modell für die primäre paroxysmale Dystonie eine gestörte Sensomotorik im Präpulsinhibitionstest aufwies (HAMANN et al. 2008, DEANDRADE et al. 2011). Im ARB-Test zeigten die DYT1 KI Mäuse signifikante Beeinträchtigungen am ersten und dritten Tag des Tests. Diese Versuchstage zeichneten sich durch multiple, sich ändernde sensorische Stimuli aus (Tag eins: Stabmaterial und –durchmesser; Tag drei: Drehgeschwindigkeit und –richtung). Am zweiten Tag hingegen wurden die Tiere mit gleichbleibender Geschwindigkeit trainiert, sodass sich am Versuchsablauf nur wenig änderte. Möglicherweise waren diese Versuchsparameter für die unterschiedlichen Ergebnisse innerhalb des Versuches verantwortlich. Bemerkenswerterweise wurden auch in humanen Dystoniekpatienten sensomotorische Defizite, insbesondere bezüglich der zeitlichen Differenzierung („temporal discrimination“), und Beeinträchtigungen der sensomotorischen Integration beschrieben, welche ebenso bei denjenigen Trägern der Mutation nachgewiesen wurden, die keine

Dystoniesymptomatik entwickeln und damit einen Endophänotyp darstellen (ABBRUZZESE und BERARDELLI 2003, FIORIO et al. 2007). Da die DYT1 KI Tiere, vergleichbar damit, ebenso keine Dystonie ausprägen, ihnen allerdings die Mutation im DYT1-Gen zugrunde liegt, lässt sich vermuten, dass diese Mäuse die Gruppe der symptomlosen Mutationsträger des Menschen repräsentieren. Dafür sprechen zum einen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, aber auch weitere Befunde aus der Literatur. Abweichungen zerebellothalamokortikaler Verschaltungen wurden sowohl im Patienten als auch in dem DYT1 KI Mausmodell nachgewiesen, wobei über eine regulatorische Funktion dieser Veränderungen auf die Penetranz diskutiert wurde (ARGYELAN et al. 2009, ULUG et al. 2011, VO et al. 2015). Außerdem zeigte das Modell weitere Ähnlichkeiten pathophysiologischer Charakteristika des Menschen, wie Veränderungen der kortikostriatalen synaptischen Plastizität (MARTELLA et al. 2014). Zudem wurde dem Protein TorsinA eine entscheidende Rolle bei der Funktion sensomotorischer Schaltkreise zugesprochen, die in dem Modell weiter erforscht werden könnte (LIANG et al. 2014). Die Resultate der vorliegenden Arbeit erhärten zusammenfassend die Hypothese, dass motorische Verhaltensdefizite zum Tragen kommen, wenn bei der Ausübung der Motorik die korrekte Verarbeitung sensorischer Informationen abverlangt wird. Dafür verantwortlich könnten die nachgewiesenen abnormen Verschaltungsmuster sein.

Da die beiden sensomotorischen Verhaltenstests zum Ende aller Versuche durchgeführt wurden, kann auch bei diesen Experimenten ein möglicher Trainingseinfluss auf die Verhaltenstests nicht ausgeschlossen werden. In einer Studie, in der das motorischen Lernen der Mäuse untersucht wurde, profitierten Wildtyp-Mäuse auf dem Rotarod von dem zuvor durchgeführten Laufbandtraining, während DYT1 KI Tiere eine signifikant schlechtere Leistung auf dem Rotarod zeigten (YOKOI et al. 2015). Demzufolge könnten die Beeinträchtigungen der zuletzt durchgeführten Verhaltenstests auf einen fehlenden Trainingseffekt der Mutanten zurückzuführen sein. Dagegen sprechen allerdings Befunde von SONG und Mitarbeitern (2012), bei denen ein bewusstes Training der Mäuse auf dem Balkentest und dem Rotarod die Leistung beider Genotypen verbesserte. Dennoch muss dabei auf die unterschiedliche Auswirkung von Trainingseffekten innerhalb derselben Verhaltenstests einerseits und dem Einfluss vielfältiger motorischer Versuche andererseits hingewiesen werden.

Obwohl auch bei Dystonieklienten kognitive Beeinträchtigungen als nicht-motorische Symptome beschrieben wurden, wenn auch sehr selten und wenig erforscht, konnten im „y-maze test“ keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen aufgedeckt werden (SCOTT et al. 2003). Dieser Test untersuchte allerdings lediglich das räumliche Kurzzeitgedächtnis und entsprach nicht den Anforderungen der sehr komplexen Analysen der Kognition, die im Menschen durchgeführt wurden. Demnach müssten zur detaillierteren Evaluierung kognitiver Funktionen in dem verwendeten Modell weiterführende und umfangreichere Verhaltensversuche angeschlossen werden. Mitunter wurde auch ein erhöhtes

Angstverhalten der Dystonie-Patienten erwähnt (LAUTERBACH et al. 2003). Im Offenfeld konnte in der vorliegenden Arbeit allerdings kein Hinweis auf eine Thigmotaxis, die auf eine verstärkte Ängstlichkeit der Tiere hindeuten würde, gefunden werden. Auch in anderen Untersuchungen, in denen diese mithilfe des „elevated plus maze tests“ konkret analysiert wurde, zeigten sich keine Verhaltensauffälligkeiten (YOKOI et al. 2009).

Insgesamt wurden mit dieser zweiten Publikation erstmalig sensomotorische Dysfunktionen in dem KI Mausmodell für die primäre Torsionsdystonie des Menschen nachgewiesen (RICHTER et al. 2016). Aufgrund der geschilderten pathophysiologischen Zusammenhänge stellt sich dieses Modell möglicherweise als geeignet dar, um weitere Einflüsse auf die Ausprägung der Symptomatik und damit auch auf die Penetranz der Erkrankung zu erforschen.

6 Zusammenfassung

Julia Gerstenberger

Sensomotorische Phänotypisierung von Mausmodellen für zentralnervöse Bewegungsstörungen

Institut für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie, Veterinärmedizinischen Fakultät, Universität Leipzig

Eingereicht im Dezember 2016

60 Seiten, 2 Publikationen, 4 Abbildungen, 2 Tabellen, 245 Literaturangaben

Schlüsselwörter: genetische Tiermodelle, Phänotypisierung, Parkinson Erkrankung, primäre Torsionsdystonie, Sensomotorik, Endophänotyp

Einleitung: Tiermodelle spielen für die Aufklärung pathophysiologischer Mechanismen und die Entwicklung erfolgsversprechender Therapieoptionen zentralnervöser Bewegungsstörungen eine unverzichtbare Rolle. Die Identifizierung von Gendefekten für die Parkinson-Krankheit und Dystonien ermöglichte die Generierung von Tiermodellen mit einer hohen „construct validity“. Weibliche transgene Thy1-aSyn Mäuse sowie DYT1 Knock-in (KI) Mäuse zeigen jedoch keine motorischen Störungen. In der vorliegenden Arbeit sollten zur Aufdeckung sensomotorischer Beeinträchtigungen, die bei Parkinson- und Dystoniepatienten beobachtet werden, detaillierte Untersuchungen des Verhaltens an diesen beiden Mausmodellen durchgeführt werden. **Zielstellung:** Zunächst sollte ein sensibler Verhaltenstest konstruiert und entwickelt werden, bei dem sich ändernde sensorische Stimuli während der Ausübung der motorischen Aufgabe impliziert werden. Bei der Etablierung dieses sogenannten „adaptiven rotierenden Balkentests“ (ARB-Test) sollte auch der Einfluss des genetischen Hintergrunds bei Wildtyp-Mäusen evaluiert werden. Daraufhin sollte überprüft werden, ob dieser Test den Endophänotyp der weiblichen Thy1-aSyn Mäuse aufdecken kann. In dem DYT1 KI Mausmodell sollte der Frage nachgegangen werden, ob die Tiere Verhaltensdefizite in spezifischen Tests zeigen, die sensomotorische Verschaltungen untersuchen. **Material und Methoden:** Die mRNA-Expression von α -Synuclein in der Substantia nigra bei männlichen und weiblichen Thy1-aSyn Mäusen wurde mithilfe der quantitativen Echtzeit-PCR (qPCR) ermittelt. Im Anschluss an die Entwicklung des neuen Verhaltensapparates für den ARB-Test wurden Thy1-aSyn Tiere beider Geschlechter in diesem Versuch getestet und ihre Leistung den Ergebnissen auf etablierten motorischen Verhaltenstests („challenging beam test“, „pole test“) gegenübergestellt. Um den Einfluss des Hintergrundstammes auf das Verhalten der Tiere auf dem ARB-Test zu untersuchen, wurden Wildtypen der reinen C57BL/6J-Linie sowie Hybrid-Tiere des Stammes C57Bl/6J \times DBA2 (BDF1) allen drei o. g. Versuchen unterzogen. Bei den Mäusen des DYT1 KI Modells wurde

der „adhesive removal test“ und der ARB-Test zur Analyse der Sensomotorik durchgeführt. Im Vergleich dazu wurden vielfältige Verhaltensparameter in einer Reihe vorwiegend motorischer (Offenfeld-Test, „challenging beam test“, „pole test“, Zylinder-Test, Block-Test, Nestbau-Test) und kognitiver („y-maze test“) Verhaltenstests ausgewertet. **Ergebnisse:** Bei den weiblichen Thy1-aSyn Mäusen wurde eine geringere Expression des Transgens im Vergleich zu den männlichen Tieren festgestellt. Der neue ARB-Test wurde erfolgreich etabliert und konnte signifikante Verhaltensdefizite der weiblichen und männlichen Mutanten des Parkinson-Modells im Vergleich zu den Kontrolltieren aufdecken. Der genetische Hintergrund beeinflusste die Leistung der Wildtypen auf diesem Balkentest. Während die DYT1 KI Tiere in den rein motorischen und kognitiven Versuchen keine Beeinträchtigungen des Verhaltens zeigten, konnten der „adhesive removal test“ sowie der neue ARB-Test signifikante sensomotorische Defizite der KI Mäuse im Unterschied zu den Wildtypen zum Vorschein bringen. **Schlussfolgerung:** Im Thy1-aSyn Mausmodell konnte die Bedeutung der sensomotorischen Integration für die Ausprägung motorischer Defizite sowie für eine mögliche Kompensation solcher motorischen Beeinträchtigungen demonstriert werden. Hierfür hat sich der neu entwickelte, sensitive ARB-Test als geeignet herausgestellt. Die Aufdeckung von Beeinträchtigungen der Sensomotorik spricht auch bei den DYT1 KI Tieren für den Einfluss einer gestörten sensomotorischen Integration bei der Ausprägung der Symptomatik. Damit eignet sich dieses Mausmodell für die Untersuchung weiterer Parameter, die Auswirkungen auf die Aufdeckung des Phänotyps und die Penetranz der Erkrankung haben sowie um die zugrunde liegenden pathophysiologischen Mechanismen zu erforschen.

7 Summary

Julia Gerstenberger

Sensorimotor phenotyping of mouse models of movement disorders of the central nervous system

Institute of Pharmacology, Pharmacy and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

Submitted in December 2016

60 pages, 2 publications, 4 figures, 2 tables, 245 references,

Keywords: genetic animal models, phenotyping, Parkinson's disease, primary torsion dystonia, sensorimotor system, endophenotype

Introduction: Animal models are pivotal for studies of pathogenesis and treatment of movement disorders of the central nervous system. Identification of genetic defects for Parkinson's disease (PD) and dystonia enabled the generation of animal models with high construct validity. However, female transgenic Thy1-aSyn mice and DYT1 knock-in (KI) mice do not exhibit motor deficits. In the present study detailed behavioural tests in both mouse models have been performed to unmask sensorimotor impairments that are observed in patients of PD and dystonia. **Aim:** Initially, a sensitive behavioural test, the so-called "adaptive rotating beam test" (ARB test) with changing sensory stimuli during motor task should be generated. Furthermore, the influence of the genetic background of wildtype mice on this test should be evaluated. Subsequently, it should be verified if this test could unmask the endophenotype of female mutants. In the mouse model of dystonia it was aimed to investigate whether DYT1 KI mice would show behavioural deficits in specific tests analyzing sensorimotor connectivity. **Material and methods:** Expression of human wildtype α -synuclein mRNA was determined in male and female Thy1-aSyn mice with quantitative real time PCR. Following the development of the new behavioural apparatus for the ARB test performances of Thy1-aSyn mice of both sexes on this test were analyzed and compared with the results of established motor tests (challenging beam test, pole test). To investigate the influence of genetic background on the animals' behavior on the ARB test, wildtypes of the pure C57BL/6J line and hybrids (C57Bl/6J \times DBA2, short BDF1) were tested by using the above-mentioned experiments. For analysis of sensorimotor function the adhesive removal test and the ARB test were performed in the DYT1 KI mouse model. By comparison, various parameter were assessed in a sequence of mainly motor (open field test, challenging beam test, pole test, cylinder test, block test, nest building test) and cognitive (y-maze test) behavior tests. **Results:** There was a lower expression of the transgene in female Thy1-aSyn mice in the substantia nigra in comparison to transgenic male mice. The novel ARB test was

successfully established and could unmask significant behavioural deficits in female and male mutants of the PD model compared to controls. The genetic background influenced the performance of wildtypes on this beam test. While DYT1 KI mice did not show significant impairments in pure motor and cognitive behavior tests, they spent more time on removing the sticker in the adhesive removal test in comparison to wildtypes. The ARB test revealed significant difficulties of the KI mice in traversing the various rods. **Conclusion:** In the Thy1-aSyn mouse model the importance of sensorimotor integration for the manifestation of motor symptoms and for the compensation of those impairments could be demonstrated. The novel, sensitive ARB test was suitable for this objective. Similarly, exposing sensorimotor deficits in DYT1 KI mice indicate the influence of abnormal sensorimotor integration on the manifestation of symptomatology. Hence, this mouse model is qualified for investigation of further parameters affecting the unmasking of the phenotype, the penetrance of the disease and of underlying pathophysiological mechanisms.

8 Literaturverzeichnis

Abbruzzese G, Berardelli A. Sensorimotor integration in movement disorders. *Mov Disord.* 2003;18:231-40.

Ahlskog JE. *Parkinson's Disease Treatment Guide for Physicians*. 1. Auflage ed. New York: Oxford University Press; 2009.

Albanese A, Bhatia K, Bressman SB, DeLong MR, Fahn S, Fung VS, et al. Phenomenology and classification of dystonia: a consensus update. *Mov Disord.* 2013;28:863-73.

Alongi P, Iaccarino L, Perani D. PET Neuroimaging: Insights on Dystonia and Tourette Syndrome and Potential Applications. *Front Neurol.* 2014;5:183.

Argyelan M, Carbon M, Niethammer M, Ulug AM, Voss HU, Bressman SB, et al. Cerebellothalamocortical connectivity regulates penetrance in dystonia. *J Neurosci.* 2009;29:9740-7.

Auluck PK, Caraveo G, Lindquist S. alpha-Synuclein: membrane interactions and toxicity in Parkinson's disease. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2010;26:211-33.

Baiguera C, Alghisi M, Pinna A, Bellucci A, De Luca MA, Frau L, et al. Late-onset Parkinsonism in Nf-kappaB/c-Rel-deficient mice. *Brain.* 2012;135:2750-65.

Benabid AL, Pollak P, Louveau A, Henry S, de Rougemont J. Combined (thalamotomy and stimulation) stereotactic surgery of the VIM thalamic nucleus for bilateral Parkinson disease. *Appl Neurophysiol.* 1987;50:344-6.

Betarbet R, Sherer TB, Di Monte DA, Greenamyre JT. Mechanistic approaches to Parkinson's disease pathogenesis. *Brain Pathol.* 2002;12:499-510.

Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci.* 2000;3:1301-6.

Bhatia KP, Marsden CD. The behavioural and motor consequences of focal lesions of the basal ganglia in man. *Brain.* 1994;117 (Pt 4):859-76.

Blandini F, Armentero MT. Animal models of Parkinson's disease. *FEBS J.* 2012;279:1156-66.

- Blandini F, Nappi G, Tassorelli C, Martignoni E. Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 2000;62:63-88.
- Blesa J, Przedborski S. Parkinson's disease: animal models and dopaminergic cell vulnerability. *Front Neuroanat.* 2014;8:155.
- Boguszewski P, Zagrodzka J. Emotional changes related to age in rats--a behavioral analysis. *Behav Brain Res.* 2002;133:323-32.
- Bolam JP, Hanley JJ, Booth PAC, Bevan MD. Synaptic organisation of the basal ganglia. *Journal of Anatomy.* 2000;196:527-42.
- Bouet V, Boulouard M, Toutain J, Divoux D, Bernaudin M, Schumann-Bard P, et al. The adhesive removal test: a sensitive method to assess sensorimotor deficits in mice. *Nat Protoc.* 2009;4:1560-4.
- Braak H, Braak E. Pathoanatomy of Parkinson's disease. *J Neurol.* 2000;247 Suppl 2:II3-10.
- Bragg DC, Armata IA, Nery FC, Breakefield XO, Sharma N. Molecular pathways in dystonia. *Neurobiol Dis.* 2011;42:136-47.
- Breakefield XO, Blood AJ, Li Y, Hallett M, Hanson PI, Standaert DG. The pathophysiological basis of dystonias. *Nat Rev Neurosci.* 2008;9:222-34.
- Bressman S. Genetics of dystonia. *J Neural Transm Suppl.* 2006;489-95.
- Bressman SB, de Leon D, Kramer PL, Ozelius LJ, Brin MF, Greene PE, et al. Dystonia in Ashkenazi Jews: clinical characterization of a founder mutation. *Ann Neurol.* 1994;36:771-7.
- Bressman SB, Sabatti C, Raymond D, de Leon D, Klein C, Kramer PL, et al. The DYT1 phenotype and guidelines for diagnostic testing. *Neurology.* 2000;54:1746-52.
- Brin MF, Fahn S, Moskowitz C, Friedman A, Shale HM, Greene PE, et al. Localized injections of botulinum toxin for the treatment of focal dystonia and hemifacial spasm. *Mov Disord.* 1987;2:237-54.
- Brooks SP, Dunnett SB. Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide. *Nat Rev Neurosci.* 2009;10:519-29.
- Brooks SP, Pask T, Jones L, Dunnett SB. Behavioural profiles of inbred mouse strains used as transgenic backgrounds. I: motor tests. *Genes Brain Behav.* 2004;3:206-15.

Buhmann C, Glauche V, Sturenburg HJ, Oechsner M, Weiller C, Buchel C. Pharmacologically modulated fMRI--cortical responsiveness to levodopa in drug-naïve hemiparkinsonian patients. *Brain*. 2003;126:451-61.

Buitrago MM, Schulz JB, Dichgans J, Luft AR. Short and long-term motor skill learning in an accelerated rotarod training paradigm. *Neurobiol Learn Mem*. 2004;81:211-6.

Carter RJ, Lione LA, Humby T, Mangiarini L, Mahal A, Bates GP, et al. Characterization of progressive motor deficits in mice transgenic for the human Huntington's disease mutation. *J Neurosci*. 1999;19:3248-57.

Cazorla M, de Carvalho FD, Chohan MO, Shegda M, Chuhma N, Rayport S, et al. Dopamine D2 receptors regulate the anatomical and functional balance of basal ganglia circuitry. *Neuron*. 2014;81:153-64.

Chao OY, Pum ME, Li JS, Huston JP. The grid-walking test: assessment of sensorimotor deficits after moderate or severe dopamine depletion by 6-hydroxydopamine lesions in the dorsal striatum and medial forebrain bundle. *Neuroscience*. 2012;202:318-25.

Chesselet MF, Richter F. Modelling of Parkinson's disease in mice. *Lancet Neurol*. 2011;10:1108-18.

Chesselet MF, Richter F, Zhu C, Magen I, Watson MB, Subramaniam SR. A progressive mouse model of Parkinson's disease: the Thy1-aSyn ("Line 61") mice. *Neurotherapeutics*. 2012;9:297-314.

Chiueh CC, Markey SP, Burns RS, Johannessen JN, Jacobowitz DM, Kopin IJ. Neurochemical and behavioral effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6- tetrahydropyridine (MPTP) in rat, guinea pig, and monkey. *Psychopharmacol Bull*. 1984;20:548-53.

Cole TB, Martyanova A, Palmiter RD. Removing zinc from synaptic vesicles does not impair spatial learning, memory, or sensorimotor functions in the mouse. *Brain Res*. 2001;891:253-65.

Crawley JN. Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice: experimental design and evaluation of general health, sensory functions, motor abilities, and specific behavioral tests. *Brain Res*. 1999;835:18-26.

Crawley JN. What's wrong with my mouse? Behavioral Phenotyping of Transgenic and Knockout Mice: Wiley-Interscience; 2007.

Crawley JN. Behavioral phenotyping strategies for mutant mice. *Neuron*. 2008;57:809-18.

Crawley JN, Belknap JK, Collins A, Crabbe JC, Frankel W, Henderson N, et al. Behavioral phenotypes of inbred mouse strains: implications and recommendations for molecular studies. *Psychopharmacology (Berl)*. 1997;132:107-24.

Crossman AR. Neural mechanisms in disorders of movement. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol*. 1989;93:141-9.

Curzon P, Zhang M, Radek RJ, Fox GB. The Behavioral Assessment of Sensorimotor Processes in the Mouse: Acoustic Startle, Sensory Gating, Locomotor Activity, Rotarod, and Beam Walking. In: Buccafusco JJ, editor. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. Frontiers in Neuroscience. 2nd ed. Boca Raton (FL)2009.

Dang MT, Yokoi F, Cheetham CC, Lu J, Vo V, Lovinger DM, et al. An anticholinergic reverses motor control and corticostriatal LTD deficits in Dyt1 DeltaGAG knock-in mice. *Behav Brain Res*. 2012;226:465-72.

Dang MT, Yokoi F, McNaught KS, Jengelley TA, Jackson T, Li J, et al. Generation and characterization of Dyt1 DeltaGAG knock-in mouse as a model for early-onset dystonia. *Exp Neurol*. 2005;196:452-63.

de Rijk MC, Launer LJ, Berger K, Breteler MM, Dartigues JF, Baldereschi M, et al. Prevalence of Parkinson's disease in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. *Neurology*. 2000;54:S21-3.

DeAndrade MP, Trongnetrpunya A, Yokoi F, Cheetham CC, Peng N, Wyss JM, et al. Electromyographic evidence in support of a knock-in mouse model of DYT1 Dystonia. *Mov Disord*. 2016.

DeAndrade MP, Yokoi F, van Groen T, Lingrel JB, Li Y. Characterization of Atp1a3 mutant mice as a model of rapid-onset dystonia with parkinsonism. *Behav Brain Res*. 2011;216:659-65.

Defazio G, Berardelli A, Hallett M. Do primary adult-onset focal dystonias share aetiological factors? *Brain*. 2007;130:1183-93.

Delenclos M, Carrascal L, Jensen K, Romero-Ramos M. Immunolocalization of human alpha-synuclein in the Thy1-aSyn ("Line 61") transgenic mouse line. *Neuroscience*. 2014;277:647-64.

Deuschl G, Schade-Brittinger C, Krack P, Volkmann J, Schafer H, Botzel K, et al. A randomized trial of deep-brain stimulation for Parkinson's disease. *N Engl J Med*. 2006;355:896-908.

Di Monte D, Sandy MS, Ekstrom G, Smith MT. Comparative studies on the mechanisms of paraquat and 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP+) cytotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun.* 1986;137:303-9.

Di Monte DA. The environment and Parkinson's disease: is the nigrostriatal system preferentially targeted by neurotoxins? *Lancet Neurol.* 2003;2:531-8.

Djaldetti R, Ziv I, Melamed E. The mystery of motor asymmetry in Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 2006;5:796-802.

Dluzen DE, Gao X, Story GM, Anderson LI, Kucera J, Walro JM. Evaluation of nigrostriatal dopaminergic function in adult +/+ and +/- BDNF mutant mice. *Exp Neurol.* 2001;170:121-8.

Duchen LW. Dystonia musculorum--an inherited disease of the nervous system in the mouse. *Adv Neurol.* 1976;14:353-65.

Dunham NW, Miya TS. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc.* 1957;46:208-9.

Edwards M, Wood N, Bhatia K. Unusual phenotypes in DYT1 dystonia: a report of five cases and a review of the literature. *Mov Disord.* 2003;18:706-11.

Ekstrand MI, Terzioglu M, Galter D, Zhu S, Hofstetter C, Lindqvist E, et al. Progressive parkinsonism in mice with respiratory-chain-deficient dopamine neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:1325-30.

Fahn S. Parkinson disease, the effect of levodopa, and the ELLDOPA trial. Earlier vs Later L-DOPA. *Arch Neurol.* 1999;56:529-35.

Fahn S, Jankovic J, Hallett M. *Principles and Practice of Movement Disorders.* 2. Auflage ed: Elsevier; 2011.

Fahn S, Sulzer D. Neurodegeneration and neuroprotection in Parkinson disease. *NeuroRx.* 2004;1:139-54.

Fernagut PO, Diguët E, Stefanova N, Biran M, Wenning GK, Canioni P, et al. Subacute systemic 3-nitropropionic acid intoxication induces a distinct motor disorder in adult C57Bl/6 mice: behavioural and histopathological characterisation. *Neuroscience.* 2002;114:1005-17.

Fiorio M, Gambarin M, Valente EM, Liberini P, Loi M, Cossu G, et al. Defective temporal processing of sensory stimuli in DYT1 mutation carriers: a new endophenotype of dystonia? *Brain.* 2007;130:134-42.

Fleming SM, Salcedo J, Fernagut PO, Rockenstein E, Masliah E, Levine MS, et al. Early and progressive sensorimotor anomalies in mice overexpressing wild-type human alpha-synuclein. *J Neurosci*. 2004;24:9434-40.

Fox WM. Reflex-ontogeny and behavioural development of the mouse. *Anim Behav*. 1965;13:234-41.

Fureman BE, Jinnah HA, Hess EJ. Triggers of paroxysmal dyskinesia in the calcium channel mouse mutant tottering. *Pharmacol Biochem Behav*. 2002;73:631-7.

Galvan A, Devergnas A, Wichmann T. Alterations in neuronal activity in basal ganglia-thalamocortical circuits in the parkinsonian state. *Front Neuroanat*. 2015;9:5.

Gatto NM, Rhodes SL, Manthripragada AD, Bronstein J, Cockburn M, Farrer M, et al. alpha-Synuclein gene may interact with environmental factors in increasing risk of Parkinson's disease. *Neuroepidemiology*. 2010;35:191-5.

Gautier CA, Kitada T, Shen J. Loss of PINK1 causes mitochondrial functional defects and increased sensitivity to oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:11364-9.

Gerlach M, Reichmann H, Riederer P. *Die Parkinson-Krankheit: Grundlagen, Klinik, Therapie*. 4. Auflage ed. Wien: Springer-Verlag; 2007.

Gerstenberger J, Bauer A, Helmschrodt C, Richter A, Richter F. The novel adaptive rotating beam test unmasks sensorimotor impairments in a transgenic mouse model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res*. 2016;304:102-10.

Gibb WR, Lees AJ. The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1988;51:745-52.

Goldberg MS, Fleming SM, Palacino JJ, Cepeda C, Lam HA, Bhatnagar A, et al. Parkin-deficient mice exhibit nigrostriatal deficits but not loss of dopaminergic neurons. *J Biol Chem*. 2003;278:43628-35.

Goldberg MS, Pisani A, Haburcak M, Vortherms TA, Kitada T, Costa C, et al. Nigrostriatal dopaminergic deficits and hypokinesia caused by inactivation of the familial Parkinsonism-linked gene DJ-1. *Neuron*. 2005;45:489-96.

Goodchild RE, Dauer WT. Mislocalization to the nuclear envelope: an effect of the dystonia-causing torsinA mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:847-52.

- Goodchild RE, Grundmann K, Pisani A. New genetic insights highlight 'old' ideas on motor dysfunction in dystonia. *Trends Neurosci.* 2013;36:717-25.
- Goodchild RE, Kim CE, Dauer WT. Loss of the dystonia-associated protein torsinA selectively disrupts the neuronal nuclear envelope. *Neuron.* 2005;48:923-32.
- Gotz W. [History of treatment of Parkinson disease]. *Pharm Unserer Zeit.* 2006;35:190-7.
- Granata A, Watson R, Collinson LM, Schiavo G, Warner TT. The dystonia-associated protein torsinA modulates synaptic vesicle recycling. *J Biol Chem.* 2008;283:7568-79.
- Grant LM, Richter F, Miller JE, White SA, Fox CM, Zhu C, et al. Vocalization deficits in mice over-expressing alpha-synuclein, a model of pre-manifest Parkinson's disease. *Behav Neurosci.* 2014;128:110-21.
- Gründer G, Benkert O. *Handbuch der Psychopharmakotherapie.* 2. Auflage ed. Heidelberg: Springer-Verlag; 2012.
- Grundmann K, Glockle N, Martella G, Sciamanna G, Hauser TK, Yu L, et al. Generation of a novel rodent model for DYT1 dystonia. *Neurobiol Dis.* 2012;47:61-74.
- Grundmann K, Reischmann B, Vanhoutte G, Hubener J, Teismann P, Hauser TK, et al. Overexpression of human wildtype torsinA and human DeltaGAG torsinA in a transgenic mouse model causes phenotypic abnormalities. *Neurobiol Dis.* 2007;27:190-206.
- Guhad F. Introduction to the 3Rs (refinement, reduction and replacement). *Contemp Top Lab Anim Sci.* 2005;44:58-9.
- Hamann M, Bennay M, Gernert M, Schwabe K, Koch M, Richter A. Decreased density of amygdaloid parvalbumin-positive interneurons and behavioral changes in dystonic hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Behav Neurosci.* 2008;122:36-43.
- Hannan AJ. Environmental enrichment and brain repair: harnessing the therapeutic effects of cognitive stimulation and physical activity to enhance experience-dependent plasticity. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2014;40:13-25.
- Haslinger B, Erhard P, Kampfe N, Boecker H, Rummeny E, Schwaiger M, et al. Event-related functional magnetic resonance imaging in Parkinson's disease before and after levodopa. *Brain.* 2001;124:558-70.
- Hatami A, Chesselet MF. Transgenic rodent models to study alpha-synuclein pathogenesis, with a focus on cognitive deficits. *Curr Top Behav Neurosci.* 2015;22:303-30.

Hefti F, Enz A, Melamed E. Partial lesions of the nigrostriatal pathway in the rat. Acceleration of transmitter synthesis and release of surviving dopaminergic neurones by drugs. *Neuropharmacology*. 1985;24:19-23.

Heikkila RE, Hess A, Duvoisin RC. Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the mouse: relationships between monoamine oxidase, MPTP metabolism and neurotoxicity. *Life Sci*. 1985;36:231-6.

Henderson ND. Prior treatment effects on open field behaviour of mice--a genetic analysis. *Anim Behav*. 1967;15:364-76.

Hernandez TD, Schallert T. Seizures and recovery from experimental brain damage. *Exp Neurol*. 1988;102:318-24.

Hirsch EC, Jenner P, Przedborski S. Pathogenesis of Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2013;28:24-30.

Huh R, Han IB, Chung M, Chung S. Comparison of treatment results between selective peripheral denervation and deep brain stimulation in patients with cervical dystonia. *Stereotact Funct Neurosurg*. 2010;88:234-8.

Hunot S, Hirsch EC. Neuroinflammatory processes in Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 2003;53 Suppl 3:S49-58; discussion S-60.

Iwabuchi S, Kakazu Y, Koh JY, Harata NC. Abnormal cytoplasmic calcium dynamics in central neurons of a dystonia mouse model. *Neurosci Lett*. 2013a;548:61-6.

Iwabuchi S, Koh JY, Wang K, Ho KW, Harata NC. Minimal Change in the cytoplasmic calcium dynamics in striatal GABAergic neurons of a DYT1 dystonia knock-in mouse model. *PLoS One*. 2013b;8:e80793.

Jadavji NM, Kolb B, Metz GA. Enriched environment improves motor function in intact and unilateral dopamine-depleted rats. *Neuroscience*. 2006;140:1127-38.

Jain S, Wood NW, Healy DG. Molecular genetic pathways in Parkinson's disease: a review. *Clin Sci (Lond)*. 2005;109:355-64.

Jankovic J. Treatment of dystonia. *Lancet Neurol*. 2006;5:864-72.

Jankovic J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2008;79:368-76.

Jankovic J. Treatment of hyperkinetic movement disorders. *Lancet Neurol.* 2009;8:844-56.

Jankovic J. Medical treatment of dystonia. *Mov Disord.* 2013;28:1001-12.

Jellinger KA. Pathology of Parkinson's disease. Changes other than the nigrostriatal pathway. *Mol Chem Neuropathol.* 1991;14:153-97.

Jellinger KA. How close are we to revealing the etiology of Parkinson's disease? *Expert Rev Neurother.* 2015;15:1105-7.

Jinnah H, Richter A, Mink JW, Caldwell GA, Caldwell KA, Gonzalez-Alegre P, et al. Animal models for drug discovery in dystonia. *Expert Opin Drug Discov.* 2008;3:83-97.

Jinnah HA, Hess EJ. Experimental therapeutics for dystonia. *Neurotherapeutics.* 2008;5:198-209.

Joel D, Weiner I. The organization of the basal ganglia-thalamocortical circuits: open interconnected rather than closed segregated. *Neuroscience.* 1994;63:363-79.

Jones BJ, Roberts DJ. A rotarod suitable for quantitative measurements of motor incoordination in naive mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol.* 1968;259:211.

Kadkhodaei B, Ito T, Joodmardi E, Mattsson B, Rouillard C, Carta M, et al. Nurr1 is required for maintenance of maturing and adult midbrain dopamine neurons. *J Neurosci.* 2009;29:15923-32.

Klingelhoefer L, Reichmann H. Pathogenesis of Parkinson disease--the gut-brain axis and environmental factors. *Nat Rev Neurol.* 2015;11:625-36.

Koh JY, Iwabuchi S, Harata NC. Dystonia-associated protein torsinA is not detectable at the nerve terminals of central neurons. *Neuroscience.* 2013;253:316-29.

Koob AO, Ubhi K, Paulsson JF, Kelly J, Rockenstein E, Mante M, et al. Lovastatin ameliorates alpha-synuclein accumulation and oxidation in transgenic mouse models of alpha-synucleinopathies. *Exp Neurol.* 2010;221:267-74.

Kudo T, Loh DH, Truong D, Wu Y, Colwell CS. Circadian dysfunction in a mouse model of Parkinson's disease. *Exp Neurol.* 2011;232:66-75.

Kuner R, Teismann P, Trutzel A, Naim J, Richter A, Schmidt N, et al. TorsinA, the gene linked to early-onset dystonia, is upregulated by the dopaminergic toxin MPTP in mice. *Neurosci Lett*. 2004;355:126-30.

Lam HA, Wu N, Cely I, Kelly RL, Hean S, Richter F, et al. Elevated tonic extracellular dopamine concentration and altered dopamine modulation of synaptic activity precede dopamine loss in the striatum of mice overexpressing human alpha-synuclein. *J Neurosci Res*. 2011;89:1091-102.

Lang AE. Dopamine agonists in the treatment of dystonia. *Clin Neuropharmacol*. 1985;8:38-57.

Lang AE, Lozano AM. Parkinson's disease. Second of two parts. *N Engl J Med*. 1998;339:1130-43.

Lauterbach EC, Freeman A, Vogel RL. Correlates of generalized anxiety and panic attacks in dystonia and Parkinson disease. *Cogn Behav Neurol*. 2003;16:225-33.

Le W, Sayana P, Jankovic J. Animal models of Parkinson's disease: a gateway to therapeutics? *Neurotherapeutics*. 2014;11:92-110.

Lebouvier T, Chaumette T, Paillusson S, Duyckaerts C, Bruley des Varannes S, Neunlist M, et al. The second brain and Parkinson's disease. *Eur J Neurosci*. 2009;30:735-41.

Lee HY, Nakayama J, Xu Y, Fan X, Karouani M, Shen Y, et al. Dopamine dysregulation in a mouse model of paroxysmal nonkinesigenic dyskinesia. *J Clin Invest*. 2012a;122:507-18.

Lee KW, Chen W, Junn E, Im JY, Grosso H, Sonsalla PK, et al. Enhanced phosphatase activity attenuates alpha-synucleinopathy in a mouse model. *J Neurosci*. 2011;31:6963-71.

Lee MK, Stirling W, Xu Y, Xu X, Qui D, Mandir AS, et al. Human alpha-synuclein-harboring familial Parkinson's disease-linked Ala-53 --> Thr mutation causes neurodegenerative disease with alpha-synuclein aggregation in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:8968-73.

Lee Y, Dawson VL, Dawson TM. Animal models of Parkinson's disease: vertebrate genetics. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012b;2.

Lepicard EM, Venault P, Perez-Diaz F, Joubert C, Berthoz A, Chapouthier G. Balance control and posture differences in the anxious BALB/cByJ mice compared to the non anxious C57BL/6J mice. *Behav Brain Res*. 2000;117:185-95.

- Levin BE, Katzen HL. Early cognitive changes and nondementing behavioral abnormalities in Parkinson's disease. *Adv Neurol.* 2005;96:84-94.
- Lewis MH. Environmental complexity and central nervous system development and function. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2004;10:91-5.
- Li J, Dani JA, Le W. The role of transcription factor Pitx3 in dopamine neuron development and Parkinson's disease. *Curr Top Med Chem.* 2009a;9:855-9.
- Li Y, Liu W, Oo TF, Wang L, Tang Y, Jackson-Lewis V, et al. Mutant LRRK2(R1441G) BAC transgenic mice recapitulate cardinal features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci.* 2009b;12:826-8.
- Liang CC, Tanabe LM, Jou S, Chi F, Dauer WT. TorsinA hypofunction causes abnormal twisting movements and sensorimotor circuit neurodegeneration. *J Clin Invest.* 2014;124:3080-92.
- Link CD. Transgenic invertebrate models of age-associated neurodegenerative diseases. *Mech Ageing Dev.* 2001;122:1639-49.
- Lorden JF, Lutes J, Michela VL, Ervin J. Abnormal cerebellar output in rats with an inherited movement disorder. *Exp Neurol.* 1992;118:95-104.
- Loscher W, Fisher JE, Jr., Schmidt D, Fredow G, Honack D, Iturrian WB. The sz mutant hamster: a genetic model of epilepsy or of paroxysmal dystonia? *Mov Disord.* 1989;4:219-32.
- Loscher W, Richter A, Nikkhah G, Rosenthal C, Ebert U, Hedrich HJ. Behavioral and neurochemical dysfunction in the circling (ci) rat: a novel genetic animal model of a movement disorder. *Neuroscience.* 1996;74:1135-42.
- Louis ED, Lee P, Quinn L, Marder K. Dystonia in Huntington's disease: Prevalence and clinical characteristics. *Movement Disorders.* 1999;14:95-101.
- Lubics A, Reglodi D, Tamas A, Kiss P, Szalai M, Szalontay L, et al. Neurological reflexes and early motor behavior in rats subjected to neonatal hypoxic-ischemic injury. *Behav Brain Res.* 2005;157:157-65.
- Magen I, Fleming SM, Zhu C, Garcia EC, Cardiff KM, Dinh D, et al. Cognitive deficits in a mouse model of pre-manifest Parkinson's disease. *Eur J Neurosci.* 2012;35:870-82.
- Markou A, Weiss F, Gold LH, Caine SB, Schulteis G, Koob GF. Animal models of drug craving. *Psychopharmacology (Berl).* 1993;112:163-82.

Marsden CD, Quinn NP. The dystonias. *BMJ*. 1990;300:139-44.

Martella G, Maltese M, Nistico R, Schirinzi T, Madeo G, Sciamanna G, et al. Regional specificity of synaptic plasticity deficits in a knock-in mouse model of DYT1 dystonia. *Neurobiol Dis*. 2014;65:124-32.

Masliah E, Rockenstein E, Veinbergs I, Mallory M, Hashimoto M, Takeda A, et al. Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-synuclein mice: implications for neurodegenerative disorders. *Science*. 2000;287:1265-9.

Matsuura K, Kabuto H, Makino H, Ogawa N. Pole test is a useful method for evaluating the mouse movement disorder caused by striatal dopamine depletion. *J Neurosci Methods*. 1997;73:45-8.

McDowell K, Chesselet MF. Animal models of the non-motor features of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*. 2012;46:597-606.

Meziane H, Ouagazzal AM, Aubert L, Wietrzyk M, Krezel W. Estrous cycle effects on behavior of C57BL/6J and BALB/cByJ female mice: implications for phenotyping strategies. *Genes Brain Behav*. 2007;6:192-200.

Montoya CP, Campbell-Hope LJ, Pemberton KD, Dunnett SB. The "staircase test": a measure of independent forelimb reaching and grasping abilities in rats. *J Neurosci Methods*. 1991;36:219-28.

Moseley AE, Williams MT, Schaefer TL, Bohanan CS, Neumann JC, Behbehani MM, et al. Deficiency in Na,K-ATPase alpha isoform genes alters spatial learning, motor activity, and anxiety in mice. *J Neurosci*. 2007;27:616-26.

Nacimiento W. [Parkinson-plus-syndromes]. *Fortschr Neurol Psychiatr*. 2006;74:165-78; quiz 79-80.

Nakano K, Kayahara T, Tsutsumi T, Ushiro H. Neural circuits and functional organization of the striatum. *J Neurol*. 2000;247 Suppl 5:V1-15.

Neumann M, Kahle PJ, Giasson BI, Ozmen L, Borroni E, Spooen W, et al. Misfolded proteinase K-resistant hyperphosphorylated alpha-synuclein in aged transgenic mice with locomotor deterioration and in human alpha-synucleinopathies. *J Clin Invest*. 2002;110:1429-39.

Neuwald AF, Aravind L, Spouge JL, Koonin EV. AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res*. 1999;9:27-43.

- Neychev VK, Gross RE, Lehericy S, Hess EJ, Jinnah HA. The functional neuroanatomy of dystonia. *Neurobiol Dis.* 2011;42:185-201.
- Nithianantharajah J, Hannan AJ. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nat Rev Neurosci.* 2006;7:697-709.
- Nuber S, Petrasch-Parwez E, Winner B, Winkler J, von Horsten S, Schmidt T, et al. Neurodegeneration and motor dysfunction in a conditional model of Parkinson's disease. *J Neurosci.* 2008;28:2471-84.
- Ogawa N, Hirose Y, Ohara S, Ono T, Watanabe Y. A simple quantitative bradykinesia test in MPTP-treated mice. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 1985;50:435-41.
- Ohlsson AL, Johansson BB. Environment influences functional outcome of cerebral infarction in rats. *Stroke.* 1995;26:644-9.
- Ouary S, Bizat N, Altairac S, Menetrat H, Mittoux V, Conde F, et al. Major strain differences in response to chronic systemic administration of the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid in rats: implications for neuroprotection studies. *Neuroscience.* 2000;97:521-30.
- Ozelius L, Lubarr N. DYT1 Early-Onset Primary Dystonia. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJH, et al., editors. *GeneReviews(R)*. Seattle (WA)1993.
- Ozelius LJ, Hewett JW, Page CE, Bressman SB, Kramer PL, Shalish C, et al. The early-onset torsion dystonia gene (DYT1) encodes an ATP-binding protein. *Nat Genet.* 1997;17:40-8.
- Page ME, Bao L, Andre P, Pelta-Heller J, Sluzas E, Gonzalez-Alegre P, et al. Cell-autonomous alteration of dopaminergic transmission by wild type and mutant (DeltaE) TorsinA in transgenic mice. *Neurobiol Dis.* 2010;39:318-26.
- Parent A, Hazrati LN. Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Res Brain Res Rev.* 1995;20:91-127.
- Paylor R, Crawley JN. Inbred strain differences in prepulse inhibition of the mouse startle response. *Psychopharmacology (Berl).* 1997;132:169-80.
- Pearce RK, Jackson M, Smith L, Jenner P, Marsden CD. Chronic L-DOPA administration induces dyskinesias in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Mov Disord.* 1995;10:731-40.

Perez RG, Waymire JC, Lin E, Liu JJ, Guo F, Zigmond MJ. A role for alpha-synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis. *J Neurosci*. 2002;22:3090-9.

Peterson DA, Sejnowski TJ, Poizner H. Convergent evidence for abnormal striatal synaptic plasticity in dystonia. *Neurobiol Dis*. 2010;37:558-73.

Picard N, Strick PL. Motor areas of the medial wall: a review of their location and functional activation. *Cereb Cortex*. 1996;6:342-53.

Pollak P, Benabid AL, Gross C, Gao DM, Laurent A, Benazzouz A, et al. [Effects of the stimulation of the subthalamic nucleus in Parkinson disease]. *Rev Neurol (Paris)*. 1993;149:175-6.

Postuma RB, Aarsland D, Barone P, Burn DJ, Hawkes CH, Oertel W, et al. Identifying prodromal Parkinson's disease: pre-motor disorders in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2012;27:617-26.

Quartarone A, Pisani A. Abnormal plasticity in dystonia: Disruption of synaptic homeostasis. *Neurobiol Dis*. 2011;42:162-70.

Richfield EK, Thiruchelvam MJ, Cory-Slechta DA, Wuertzer C, Gainetdinov RR, Caron MG, et al. Behavioral and neurochemical effects of wild-type and mutated human alpha-synuclein in transgenic mice. *Exp Neurol*. 2002;175:35-48.

Richter A, Hamann M, Wissel J, Volk HA. Dystonia and Paroxysmal Dyskinesias: Under-Recognized Movement Disorders in Domestic Animals? A Comparison with Human Dystonia/Paroxysmal Dyskinesias. *Front Vet Sci*. 2015;2:65.

Richter A, Loscher W. Pathology of idiopathic dystonia: findings from genetic animal models. *Prog Neurobiol*. 1998;54:633-77.

Richter F, Gao F, Medvedeva V, Lee P, Bove N, Fleming SM, et al. Chronic administration of cholesterol oximes in mice increases transcription of cytoprotective genes and improves transcriptome alterations induced by alpha-synuclein overexpression in nigrostriatal dopaminergic neurons. *Neurobiol Dis*. 2014;69:263-75.

Richter F, Gerstenberger J, Bauer A, Liang CC, Richter A. Sensorimotor tests unmask a phenotype in the DYT1 knock-in mouse model of dystonia. *Behav Brain Res*. 2016;317:536-41.

Richter F, Richter A. Genetic animal models of dystonia: Common features and diversities. *Prog Neurobiol*. 2014;121C:91-113.

- Rockenstein E, Mallory M, Hashimoto M, Song D, Shults CW, Lang I, et al. Differential neuropathological alterations in transgenic mice expressing alpha-synuclein from the platelet-derived growth factor and Thy-1 promoters. *J Neurosci Res.* 2002;68:568-78.
- Rogers DC, Jones DN, Nelson PR, Jones CM, Quilter CA, Robinson TL, et al. Use of SHIRPA and discriminant analysis to characterise marked differences in the behavioural phenotype of six inbred mouse strains. *Behav Brain Res.* 1999;105:207-17.
- Roos BE, Steg G. The Effect of L-3, 4-Dihydroxyphenylalanine and Dl-5-Hydroxytryptophan on Rigidity and Tremor Induced by Reserpine, Chlorpromazine and Phenoxybenzamine. *Life Sci.* 1964;3:351-60.
- Sanberg PR, Bunsey MD, Giordano M, Norman AB. The catalepsy test: its ups and downs. *Behav Neurosci.* 1988;102:748-59.
- Sango K, McDonald MP, Crawley JN, Mack ML, Tifft CJ, Skop E, et al. Mice lacking both subunits of lysosomal beta-hexosaminidase display gangliosidosis and mucopolysaccharidosis. *Nat Genet.* 1996;14:348-52.
- Sato K, Sumi-Ichinose C, Kaji R, Ikemoto K, Nomura T, Nagatsu I, et al. Differential involvement of striosome and matrix dopamine systems in a transgenic model of dopa-responsive dystonia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:12551-6.
- Schaar KL, Brenneman MM, Savitz SI. Functional assessments in the rodent stroke model. *Exp Transl Stroke Med.* 2010;2:13.
- Schadt CR, Charles PD, Davis TL, Konrad PE. Thalamotomy, DBS-Vim, and DBS-GPi for generalized dystonia: a case report. *Tenn Med.* 2007;100:38-9.
- Schallert T, Upchurch M, Lobaugh N, Farrar SB, Spirduso WW, Gilliam P, et al. Tactile extinction: distinguishing between sensorimotor and motor asymmetries in rats with unilateral nigrostriatal damage. *Pharmacol Biochem Behav.* 1982;16:455-62.
- Schapira AH. Science, medicine, and the future: Parkinson's disease. *BMJ.* 1999;318:311-4.
- Schapira AH. Present and future drug treatment for Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2005;76:1472-8.
- Schrag A, Quinn N. Dyskinesias and motor fluctuations in Parkinson's disease. A community-based study. *Brain.* 2000;123 (Pt 11):2297-305.
- Schulz JB. Neuronal pathology in Parkinson's disease. *Cell Tissue Res.* 2005;320:211.

Sciamanna G, Ponterio G, Tassone A, Maltese M, Madeo G, Martella G, et al. Negative allosteric modulation of mGlu5 receptor rescues striatal D2 dopamine receptor dysfunction in rodent models of DYT1 dystonia. *Neuropharmacology*. 2014.

Scott RB, Gregory R, Wilson J, Banks S, Turner A, Parkin S, et al. Executive cognitive deficits in primary dystonia. *Mov Disord*. 2003;18:539-50.

Sedelis M, Hofele K, Auburger GW, Morgan S, Huston JP, Schwarting RK. MPTP susceptibility in the mouse: behavioral, neurochemical, and histological analysis of gender and strain differences. *Behav Genet*. 2000;30:171-82.

Sedelis M, Schwarting RK, Huston JP. Behavioral phenotyping of the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res*. 2001;125:109-25.

Sharma N, Baxter MG, Petravic J, Bragg DC, Schiend A, Standaert DG, et al. Impaired motor learning in mice expressing torsinA with the DYT1 dystonia mutation. *J Neurosci*. 2005;25:5351-5.

Shashidharan P, Sandu D, Potla U, Armata IA, Walker RH, McNaught KS, et al. Transgenic mouse model of early-onset DYT1 dystonia. *Hum Mol Genet*. 2005;14:125-33.

Sian J, Gerlach M, Youdim MB, Riederer P. Parkinson's disease: a major hypokinetic basal ganglia disorder. *J Neural Transm (Vienna)*. 1999;106:443-76.

Smeets WJ, Marin O, Gonzalez A. Evolution of the basal ganglia: new perspectives through a comparative approach. *Journal of Anatomy*. 2000;196 (Pt 4):501-17.

Smith Y, Kieval JZ. Anatomy of the dopamine system in the basal ganglia. *Trends Neurosci*. 2000;23:S28-33.

Song CH, Bernhard D, Bolarinwa C, Hess EJ, Smith Y, Jinnah HA. Subtle microstructural changes of the striatum in a DYT1 knock-in mouse model of dystonia. *Neurobiol Dis*. 2013;54:362-71.

Song CH, Bernhard D, Hess EJ, Jinnah HA. Subtle microstructural changes of the cerebellum in a knock-in mouse model of DYT1 dystonia. *Neurobiol Dis*. 2014;62:372-80.

Song CH, Fan X, Exeter CJ, Hess EJ, Jinnah HA. Functional analysis of dopaminergic systems in a DYT1 knock-in mouse model of dystonia. *Neurobiol Dis*. 2012;48:66-78.

- Song DD, Shults CW, Sisk A, Rockenstein E, Masliah E. Enhanced substantia nigra mitochondrial pathology in human alpha-synuclein transgenic mice after treatment with MPTP. *Exp Neurol*. 2004;186:158-72.
- Sossi V, de la Fuente-Fernandez R, Nandhagopal R, Schulzer M, McKenzie J, Ruth TJ, et al. Dopamine turnover increases in asymptomatic LRRK2 mutations carriers. *Mov Disord*. 2010;25:2717-23.
- Spillantini MG, Goedert M. The alpha-synucleinopathies: Parkinson's disease, dementia with Lewy bodies, and multiple system atrophy. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;920:16-27.
- Stanford SC. The Open Field Test: reinventing the wheel. *J Psychopharmacol*. 2007;21:134-5.
- Suchowersky O, Gronseth G, Perlmuter J, Reich S, Zesiewicz T, Weiner WJ, et al. Practice Parameter: neuroprotective strategies and alternative therapies for Parkinson disease (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*. 2006;66:976-82.
- Swallow JG, Carter PA, Garland T, Jr. Artificial selection for increased wheel-running behavior in house mice. *Behav Genet*. 1998;28:227-37.
- Takeda H, Tsuji M, Matsumiya T. Changes in head-dipping behavior in the hole-board test reflect the anxiogenic and/or anxiolytic state in mice. *Eur J Pharmacol*. 1998;350:21-9.
- Tanabe LM, Martin C, Dauer WT. Genetic background modulates the phenotype of a mouse model of DYT1 dystonia. *PLoS One*. 2012;7:e32245.
- Tarantino LM, Gould TJ, Druhan JP, Bucan M. Behavior and mutagenesis screens: the importance of baseline analysis of inbred strains. *Mamm Genome*. 2000;11:555-64.
- Taylor TN, Caudle WM, Shepherd KR, Noorian A, Jackson CR, Iuvone PM, et al. Nonmotor symptoms of Parkinson's disease revealed in an animal model with reduced monoamine storage capacity. *J Neurosci*. 2009;29:8103-13.
- Thenganatt MA, Jankovic J. Treatment of dystonia. *Neurotherapeutics*. 2014;11:139-52.
- Thiruchelvam M, Richfield EK, Baggs RB, Tank AW, Cory-Slechta DA. The nigrostriatal dopaminergic system as a preferential target of repeated exposures to combined paraquat and maneb: implications for Parkinson's disease. *J Neurosci*. 2000;20:9207-14.
- Tinazzi M, Fiaschi A, Frasson E, Fiorio M, Cortese F, Aglioti SM. Deficits of temporal discrimination in dystonia are independent from the spatial distance between the loci of tactile stimulation. *Mov Disord*. 2002;17:333-8.

Tinazzi M, Rosso T, Fiaschi A. Role of the somatosensory system in primary dystonia. *Mov Disord.* 2003;18:605-22.

Tisch S, Silberstein P, Limousin-Dowsey P, Jahanshahi M. The basal ganglia: anatomy, physiology, and pharmacology. *Psychiatr Clin North Am.* 2004;27:757-99.

Tolosa E, Compta Y. Dystonia in Parkinson's disease. *J Neurol.* 2006;253 Suppl 7:VII7-13.

Tong Y, Shen J. alpha-synuclein and LRRK2: partners in crime. *Neuron.* 2009;64:771-3.

Tryon RC. Reliability and behavior domain validity: reformulation and historical critique. *Psychol Bull.* 1957;54:229-49.

Ulug AM, Vo A, Argyelan M, Tanabe L, Schiffer WK, Dewey S, et al. Cerebellothalamocortical pathway abnormalities in torsinA DYT1 knock-in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108:6638-43.

Ungerstedt U. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol.* 1968;5:107-10.

Upchurch M, Schallert T. A behavior analysis of the offspring of "haloperidol-sensitive" and "haloperidol-resistant" gerbils. *Behav Neural Biol.* 1983;39:221-8.

Valentinuzzi VS, Scarbrough K, Takahashi JS, Turek FW. Effects of aging on the circadian rhythm of wheel-running activity in C57BL/6 mice. *Am J Physiol.* 1997;273:R1957-64.

van Dellen A, Blakemore C, Deacon R, York D, Hannan AJ. Delaying the onset of Huntington's in mice. *Nature.* 2000;404:721-2.

van der Staay FJ, Arndt SS, Nordquist RE. Evaluation of animal models of neurobehavioral disorders. *Behav Brain Funct.* 2009;5:11.

Villar-Pique A, da Fonseca TL, Outeiro TF. Structure, function and toxicity of alpha-synuclein: the Bermuda triangle in synucleinopathies. *J Neurochem.* 2015.

Vitek JL. Pathophysiology of dystonia: A neuronal model. *Movement Disorders.* 2002;17:S49-S62.

Vitek JL, Giroux M. Physiology of hypokinetic and hyperkinetic movement disorders: model for dyskinesia. *Ann Neurol.* 2000;47:S131-40.

- Vo A, Sako W, Niethammer M, Carbon M, Bressman SB, Ulug AM, et al. Thalamocortical Connectivity Correlates with Phenotypic Variability in Dystonia. *Cereb Cortex*. 2015;25:3086-94.
- Wang L, Fleming SM, Chesselet MF, Tache Y. Abnormal colonic motility in mice overexpressing human wild-type alpha-synuclein. *Neuroreport*. 2008a;19:873-6.
- Wang L, Magen I, Yuan PQ, Subramaniam SR, Richter F, Chesselet MF, et al. Mice overexpressing wild-type human alpha-synuclein display alterations in colonic myenteric ganglia and defecation. *Neurogastroenterol Motil*. 2012;24:e425-36.
- Wang L, Xie C, Greggio E, Parisiadou L, Shim H, Sun L, et al. The chaperone activity of heat shock protein 90 is critical for maintaining the stability of leucine-rich repeat kinase 2. *J Neurosci*. 2008b;28:3384-91.
- Watson JB, Hatami A, David H, Masliah E, Roberts K, Evans CE, et al. Alterations in corticostriatal synaptic plasticity in mice overexpressing human alpha-synuclein. *Neuroscience*. 2009;159:501-13.
- Williams NR, Foote KD, Okun MS. STN vs. GPi Deep Brain Stimulation: Translating the Rematch into Clinical Practice. *Mov Disord Clin Pract*. 2014;1:24-35.
- Willner P. The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology (Berl)*. 1984;83:1-16.
- Wilson BK, Hess EJ. Animal models for dystonia. *Mov Disord*. 2013;28:982-9.
- Wooley CM, Sher RB, Kale A, Frankel WN, Cox GA, Seburn KL. Gait analysis detects early changes in transgenic SOD1(G93A) mice. *Muscle Nerve*. 2005;32:43-50.
- Wu N, Joshi PR, Cepeda C, Masliah E, Levine MS. Alpha-synuclein overexpression in mice alters synaptic communication in the corticostriatal pathway. *J Neurosci Res*. 2010;88:1764-76.
- Yang M, Crawley JN. Simple behavioral assessment of mouse olfaction. *Curr Protoc Neurosci*. 2009;Chapter 8:Unit 8 24.
- Yokoi F, Dang MT, Li J, Li Y. Myoclonus, motor deficits, alterations in emotional responses and monoamine metabolism in epsilon-sarcoglycan deficient mice. *J Biochem*. 2006;140:141-6.

Yokoi F, Dang MT, Liu J, Gandre JR, Kwon K, Yuen R, et al. Decreased dopamine receptor 1 activity and impaired motor-skill transfer in Dyt1 DeltaGAG heterozygous knock-in mice. *Behav Brain Res.* 2015;279:202-10.

Yokoi F, Dang MT, Miller CA, Marshall AG, Campbell SL, Sweatt JD, et al. Increased c-fos expression in the central nucleus of the amygdala and enhancement of cued fear memory in Dyt1 DeltaGAG knock-in mice. *Neurosci Res.* 2009;65:228-35.

York JM, Blevins NA, McNeil LK, Freund GG. Mouse short- and long-term locomotor activity analyzed by video tracking software. *J Vis Exp.* 2013.

Yu S, Ueda K, Chan P. Alpha-synuclein and dopamine metabolism. *Mol Neurobiol.* 2005;31:243-54.

Z'Graggen WJ, Metz GA, Kartje GL, Thallmair M, Schwab ME. Functional recovery and enhanced corticofugal plasticity after unilateral pyramidal tract lesion and blockade of myelin-associated neurite growth inhibitors in adult rats. *J Neurosci.* 1998;18:4744-57.

Zeng BY, Heales SJ, Canevari L, Rose S, Jenner P. Alterations in expression of dopamine receptors and neuropeptides in the striatum of GTP cyclohydrolase-deficient mice. *Exp Neurol.* 2004;190:515-24.

Zhang L, Yokoi F, Jin YH, DeAndrade MP, Hashimoto K, Standaert DG, et al. Altered dendritic morphology of Purkinje cells in Dyt1 DeltaGAG knock-in and purkinje cell-specific Dyt1 conditional knockout mice. *PLoS One.* 2011;6:e18357.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt *Frau Prof. Dr. A. Richter* für die Vergabe des spannenden Themas, die hervorragende wissenschaftliche Betreuung, die Unterstützung bei der Entstehung dieser Dissertation sowie das entgegengebrachte Vertrauen.

Außerdem danke ich *Dr. Franziska Richter* sehr herzlich für die intensive Betreuung der wissenschaftlichen Experimente, die fachliche Einweisung in die Verhaltensuntersuchungen, die Unterstützung bei deren Auswertung und vor allem für ihr stets freundliches und offenes Gemüt sowie Ihren optimistischen Forschergeist.

Bei *Steffi Fuchs* und *Ina Hochheim* bedanke ich mich für die unkomplizierte und unterstützende labortechnische Zusammenarbeit und die liebevolle Betreuung der Versuchstiere sowie ihren Beitrag zu dem humorvollen Arbeitsklima.

Mein großer Dank gilt weiterhin meinen Doktorgeschwistern *Anne Bauer*, *Christine Spröte*, *Laura Klein*, *Marieke Gringmuth* und *Christoph Bode*, die für den freundschaftlichen und familiären Alltag unserer Arbeitsgruppe verantwortlich waren und mir unvergessliche Momente am Institut schenkten.

Zudem bedanke ich mich bei allen *weiteren Mitarbeitern* des Instituts für das kollegiale Miteinander und die freundliche Arbeitsatmosphäre.

Ganz herzlich danke ich meinen *Eltern*, die mich auf meinem Weg bedingungslos unterstützten, ermutigten und immer an mich glaubten. Meinem Vati verdanke ich außerdem die technische Unterstützung bei verschiedenen Versuchen und danke ihm für sein großes Engagement. Ich danke besonders auch meinem Bruder *Tino* und meinen lieben *Großeltern* für ihre Motivation, Liebe und Zuwendung.